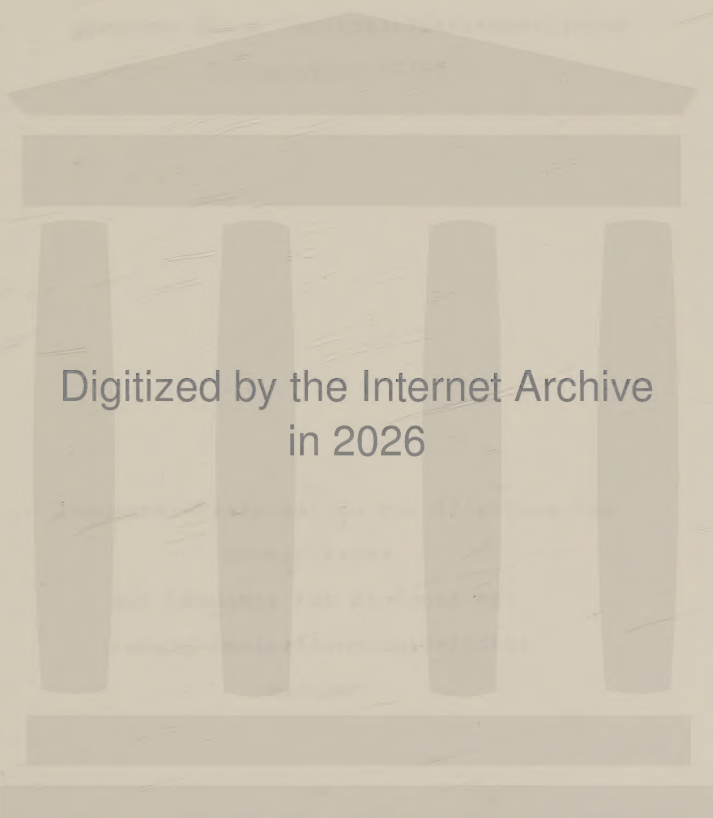


NEUE ASPEKTE DER SPEKTRALEN EMPFINDLICHKEIT
VON CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA
GEWONNEN DURCH FOURIERINTERFEROMETRISCHE
STIMULATION (FIS)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades
der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
RÜDIGER PAUL
aus Neuburg an der Donau

Januar 1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549026_0037

Neue Aspekte der spektralen Empfindlichkeit
von *Calliphora erythrocephala*
gewonnen durch fourierinterferometrische
Stimulation (FIS)

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades
der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Rüdiger Paul
aus Neuburg an der Donau

Januar 1981



1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. R. Gemperlein

2. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Smola

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juli 1981

Es ist sicher, daß niemals ...
ein Mensch irgend etwas mit end-
gültiger Gewißheit wissen wird.
Denn keiner ist so gelehrt, daß
er auch nur die Natur und Eigen-
schaften einer einzigen Fliege
wüßte ...

Roger Bacon

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 1977 bis September 1980 unter der Leitung von Herrn Dr. Roland Gemperlein am Zoologischen Institut der Universität München ausgeführt.

Herrn Dr. Gemperlein danke ich herzlich für das Interesse und die Unterstützung, die er dieser Arbeit und mir persönlich jederzeit zuteil werden ließ.

Weiterhin gilt mein Dank den Diplomphysikern Erwin Lindauer und Andreas Steiner für ihre tatkräftige Hilfe bei der Entwicklung der Methodik und bei der Durchführung der Experimente.

Ferner danke ich den Herren von den Werkstätten des Hauses, vor allem Herrn J. Weber. Ohne ihre präzise Arbeit wären die Entwicklung von FIS und die vorliegenden Messungen nicht möglich gewesen.

Die Entwicklung von FIS wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziert.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Einleitung 1

1. Methodik

1.1 Fourierinterferometrische Stimulation (FIS) 3

Reiz und Reaktion 3

Reizformen 4

Verwendung eines Michelson-Interferometers - Vorteile der Fourierspektroskopie bzw. der fourierinterferometrischen Stimulation 13

FIS, der Frequenzgang und die Nichtlinearität der biologischen Objekte 20

1.2 Zur UV-Empfindlichkeit der Insekten 24

1.3 Mathematisch-physikalische Grundlagen der Fourierspektroskopie 31

Auflösung 35

Digitalisierung 36

Interferogrammform 42

Lichtstärke- oder Jacquinot-Vorteil 44

Multiplex- oder Fellgett-Vorteil 46

Rauschen 47

Fehlerquellen 48

1.4 Versuchsaufbau - Elektronik 51

1.5 Rechnersystem und Programme 61

1.6 Elektroden und Präparationsmethoden 73

2. Ergebnisse

2.1 Testmessungen zur Prüfung der Methodik 77

Testmessungen 77

Rauschen 96

Nichtlinearität 100

Korrektur 101

Interferogrammform 104

2.2 Bestimmung der spektralen Empfindlichkeit von *Calliphora erythrocephala* 108

Interferogramm und Spektrum 108

Varianz der Messungen 115

Analyse des Summenpotentials 118

Feinstruktur im UV 121

Intrazelluläre Messungen 137

Chromatische Adaptation 144

Hyperpolarisierendes ERG 146

Diskussion der Feinstruktur 148

Die Beeinflussung der spektralen

Empfindlichkeit durch Abschirmpigmente 157

Die nichtlinearen Teile der Reaktion 160

2.3 Die Bestimmung der spektralen Empfindlichkeit bei

Mensch und Schmetterling 163

Bibliographie 170

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird eine für die Biologie neue Methode vorgestellt, die Fourierspektroskopie (FSP) bzw. die fourierinterferometrische Stimulation (FIS). Es handelt sich um ein spektrales Analyse- bzw. Stimulationsverfahren. Bei FSP erfolgt die Analyse der spektralen Elemente gleichzeitig, bei FIS wird mit allen spektralen Lichtern einer Lampe gleichzeitig gereizt. Dies führt zu einer entscheidenden Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses (MULTIPLY-Vorteil). Bei den herkömmlichen Verfahren beruht die spektrale Analyse bzw. Lichtreizgenerierung auf der Auswahl eines kleinen Teils des Spektrums (Prisma, Gitter mit Ein- und Austrittsspalten oder Farbfilter). Bei der FSP bzw. FIS werden nicht bestimmte Spektralbereiche unterdrückt, sondern die einzelnen Elemente des Spektrums durch eine Interferenzanordnung geeignet codiert. Eine wesentliche Verminderung der Lichtstärke findet dabei nicht statt (LICHTSTÄRKE-Vorteil). FSP bzw FIS sind zudem Verfahren, die eine sehr schnelle Messung (im Sekundenbereich) von Absorptionsspektren bzw. spektralen Empfindlichkeiten bei gleichzeitiger hoher Auflösung (im Nanometerbereich) erlauben.

Ein für physiologische Messungen tauglicher Versuchsaufbau wurde entwickelt, in dessen Mittelpunkt ein Michelson-Interferometer für den nahen infraroten, den sichtbaren und den UV-Bereich (bis mindestens 250 nm) steht. Testmessungen belegen die hohe Qualität der Apparatur. Die Grundlagen des Verfahrens werden erläutert.

Messungen der spektralen Empfindlichkeit von *Calliphora erythrocephala* mit diesem Verfahren lieferten wichtige neue Erkenntnisse. Eine erstmalig festgestellte Feinstruktur im Ultraviolett ist ein wesentlicher Beitrag zur momentan geführten Diskussion über die Ursachen der hohen UV-Empfindlichkeit von Insekten. Weitere Ergebnisse zeigen unter anderem eine nahezu vollständige Übereinstimmung der Empfindlichkeit im Sichtbaren mit der Absorption eines Rhodopsins und eine hohe zeitliche und individuelle Stabilität der spektralen Empfindlichkeit.

Abgesehen von der Bestimmung der spektralen Empfindlichkeit könnten fourierinterferometrische Verfahren aufgrund ihrer Vorteile auch für andere biologische und biochemische Bereiche von großer Bedeutung werden.

Einleitung

Die klassischen Arbeiten von Karl von Frisch (von Frisch 1914) stehen am Beginn eines neuen Kapitels der Physiologie, nämlich der Untersuchung des Farbensehens bei Wirbellosen. Karl von Frisch konnte mit Dressurversuchen zeigen, daß "Farbe" für Bienen eine eigene Qualität darstellt, die von unbuntem Licht verschiedener Helligkeit klar unterschieden wird.

Zu Erklärung der Farbwahrnehmung - auch der des Menschen - gab es zwei Theorien. Autrum, Burkhardt und von Zwehl gelang der Nachweis, daß die Dreirezeptortheorie von Young und Helmholtz mit sehr großer Wahrscheinlichkeit auch für Wirbellose gültig ist (Autrum u. von Zwehl 1962, 1964, Burkhardt 1962). Durch intrazelluläre Ableitungen bei Bienen und Fliegen wurde dabei das Vorkommen von drei Sehzellgruppen unterschiedlicher spektraler Empfindlichkeit gezeigt.

Als Sehfarbstoff konnte auch bei den Wirbellosen Rhodopsin identifiziert werden (u.a. Goldsmith 1958, Goldsmith u. Warner 1964, Langer u. Thorell 1966). Unerklärlich blieb aber lange Zeit die hohe UV-Empfindlichkeit vieler Insekten. Eine Reihe von Hypothesen wurde als Erklärung dafür diskutiert, unter anderem das Vorhandensein eines zweiten Pigmentsystems (Horridge u. Mimura 1975, Rosner 1975). Doch als die wahrscheinlichste Erklärung stellt sich die in den letzten Jahren entwickelte Satellitenpigmenttheorie dar (Kirschfeld, Franceschini u. Minke 1977).

Nach einer Idee von Dr. R. Gemperlein wurde in den letzten Jahren eine neue Methode zur Bestimmung der spektralen Empfindlichkeit entwickelt, die sogenannte fourierinterferometrische Stimulation (FIS). Es handelt sich um eine dynamische Meßmethode, bei der ein spektral komplex zusammengesetzter Modulationsreiz ausgeübt wird. Das Verfahren bietet große Vorteile (Kapitel 1.1).

Nachdem gezeigt werden konnte, daß der Weg methodisch prinzipiell gangbar war (Paul 1977, Gemperlein, Parsche u. Paul 1977), wurde die methodische Entwicklung nun abgeschlossen und FIS zu einem sehr leistungsfähigen Verfahren ausgebaut. Mit Hilfe dieser Methode wurden neue Gesichtspunkte zur spektralen Empfindlichkeit der Insekten erarbeitet.

1. Methodik

1.1 Fourierinterferometrische Stimulation (FIS)

Die folgenden Erläuterungen beziehen sich bei der Angabe von Zellreaktionen, wenn nicht anders aufgeführt, auf Ergebnisse, die bei *Calliphora erythrocephala* gewonnen wurden.

Reiz und Reaktion:

Eine Sehzelle reagiert auf einen ihr dargebotenen Lichtreiz mit einer Änderung ihres Potentials zum Außenmedium.

Die Stärke der Veränderung hängt von gewissen Reiz- und Zellparametern ab. Als Reizparameter sind die Lichtintensität zu einem gegebenen Zeitpunkt, die spektrale Zusammensetzung und der Polarisationsgrad des Lichtes zu nennen. Zellparameter sind die von Art und Lage der Sehpigmente abhängigen spektralen und polarisationsgradabhängigen Empfindlichkeiten. Außerdem bestimmen Adaptations- und Übertragungsverhalten (Frequenzgang) die jeweilige Reaktionsstärke.

Weitere Faktoren, die in Betracht gezogen werden müssen, ergeben sich aus der Lage der Zelle im Gewebe. So muß geprüft werden, ob die Funktion der Sehzelle durch andere Seh- oder Begleitzellen beeinflusst wird. Auch besteht die Möglichkeit, daß Schirmpigmente in und außerhalb der Zelle oder Eigenschaften des optischen Weges die Reaktion verändern.

Erschwerend kommt bei der Bestimmung der Normalreaktion eine starke Variabilität der Untersuchungsobjekte hinzu (z.B.

bei *Calliphora* in Abhängigkeit von der Nahrung (Kuo 1979) oder bei *Periplaneta* in Abhängigkeit von der Augenregion (Walther u. Dodt 1959)).

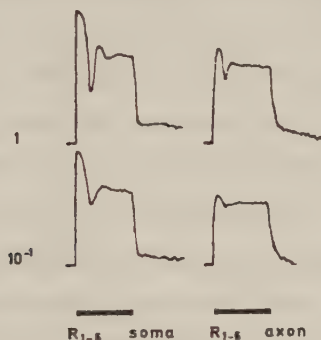
Reizformen:

Zur Bestimmung der Zellreaktion finden verschiedene Reizformen Verwendung. Der am häufigsten verwendete Reiz zur Ermittlung der Reaktion auf Licht ist der Rechteckreiz. Lichtblitze werden unter anderem bei systemanalytischen Ansätzen verwendet (Impulsantwort). Eine dritte mögliche Reizform sind sinusförmige Abweichungen von einer mittleren Intensität. Daneben gibt es noch spezielle Reizformen, z.B. Gaußsches Rauschen (Marmarelis u. Marmarelis 1978).

Bei der Rechteckreizung ist der Wechsel zwischen zwei qualitativ unterschiedlichen Adaptationszuständen der Zelle, nämlich den Zuständen der Dunkel- und der Helladaptation problematisch. Die Blitzreizung kann zur Systemüberlastung und damit zum Verlassen einfacher Beziehungen von Reiz und Antwort führen. Die sinusförmige Reizung der Sehzellen führt zu einer annähernd sinusförmigen Reaktion. Man kann diese sinusähnliche Antwort in die Grundschiwingung (Grundfrequenz = Reizfrequenz) und in höhere harmonische Schwingungen (Nichtlinearitäten) zerlegen. Der Anteil der Nichtlinearität an der Gesamtreaktion ist ein Maß für die Art der Beziehung zwischen Reiz und Antwort. Als Maß für die lineare Antwort gilt die Amplitude der Grundschiwingung.

Bei anderen Reizformen ist es etwas willkürlich, einen be-

stimmten Reaktionsteil als Maß für die Antwort zu verwenden. Bei intrazellulären Rechteckantworten zum Beispiel stellt sich die Frage, ob die Spitzen- oder die Plateauhöhe der Antwort als Reaktionsmaß zu nehmen ist. Entscheidet man sich für das Plateau, so ist trotzdem nicht ganz klar, welcher Teil davon als Maß sinnvoll ist (Abb. 1.1.1). Noch komplizierter ist die Situation bei den biphasischen Summenantworten auf Rechteckreizung (Autrum, Autrum u. Hoffmann 1961).



1.1.1 Rechteckantwort einer Sehzelle (aus Zettler und Järvilehto 1973)

Bei der Rechteckreizung besteht ein logarithmischer Zusammenhang zwischen dem Reiz und den Teilen der Antwort. Dies ist vorteilhaft bei der Bestimmung der Reaktion auf niedrige Intensitäten. Der logarithmische Zusammenhang ist aber bei der Quantifizierung der Antwort von Nachteil, da kleinen Antwortunterschieden große Reizunterschiede zugeordnet sind. Meß- und Ablesefehler, aber auch das Rauschen der Zelle können zu großen Fehlern führen.

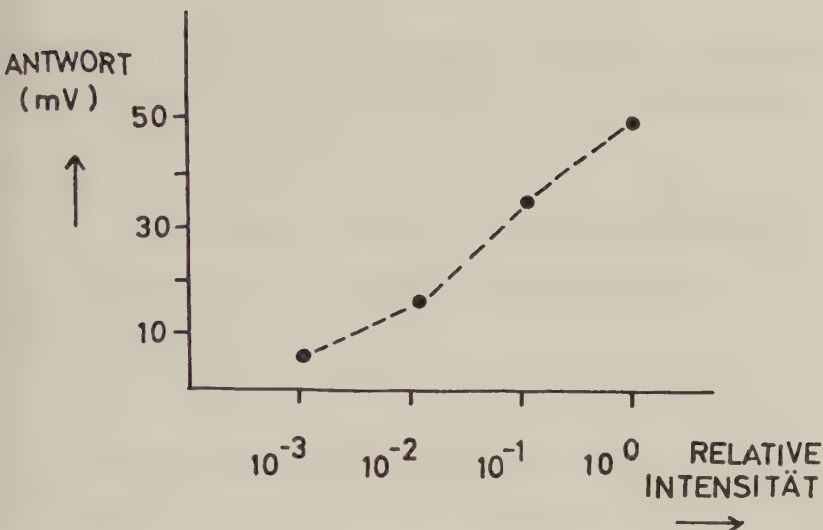
Bei Sinus- oder anderen Modulationsreizen bestehen weit-

gehend lineare Zusammenhänge zwischen der Reiz- und der Antwortveränderung (z.B. Gemperlein u. McCann 1974).

Dynamische Messungen der spektralen Empfindlichkeit sind aufgrund dieses linearen Zusammenhangs besser zur Quantifizierung des Reiz-Antwort-Zusammenhangs geeignet. Bei niedrigen Intensitäten steigt die Empfindlichkeit der Zellen aber auch absolut gesehen ihr Rauschen (Smola u. Gemperlein 1973). Dies stört die Bestimmung der spektralen Empfindlichkeit mit der dynamischen Meßmethode bei niedrigen Intensitäten.

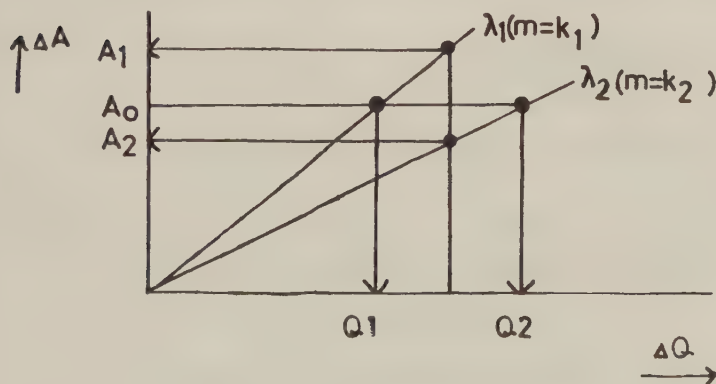
Zur Bestimmung der spektralen Empfindlichkeit von Sehzellen mit der Rechteckmethode ist neben der spektralen Messung die Ermittlung des Intensität-Antwort-Zusammenhangs (I-Kennlinie) vor oder/und nach der eigentlichen Messung notwendig. Die spektrale Empfindlichkeit ist definiert als Kehrwert der zu einer bestimmten Antworthöhe notwendigen Quantenzahl einer spezifischen Spektralkomponente. Da aus praktischen Gründen eine Manipulation der Quantenzahl zur Erfüllung dieser Definition nicht möglich ist, müssen die erhaltenen spektralen Daten nachträglich entlang dieser Kennlinie korrigiert werden (Autrum u. von Zwehl 1964). Die Abbildung 1.1.2 zeigt eine typische I-Kennlinie (nach Gemperlein u. Smola 1972).

Bei modulierten Reizen betrachtet man nicht die mittlere Intensität und die Antwort darauf, sondern die Intensitätsveränderung und die zugehörige Veränderung der Antwort. Dieser differentielle Zusammenhang ist weitgehend linear, und die zugehörigen Kennlinien lassen sich durch Geraden dar-



1.1.2 I-Kennlinie

stellen. Da gleiche Quantenmengen unterschiedlicher Wellenlänge unterschiedlich wirksam sind, sind die Geraden in Abhängigkeit von der Wellenlänge unterschiedlich steil.



1.1.3 Dynamische Kennlinien (theoretisch)

Bei unseren dynamischen Messungen errechnet sich die spektrale Empfindlichkeit, wie Dr. Gemperlein herausfand, direkt aus der Division von Antwort und Reiz. Die spektrale Empfindlichkeit läßt sich für Systeme, die mit modulierten Reizen untersucht werden, wie folgt, definieren:

Die spektrale Empfindlichkeit $S(\lambda)$ ist der Kehrwert der zur Erlangung einer bestimmten Antwortmodulation notwendigen Modulationsstärke von Licht einer spezifischen Wellenlänge.

Man erhält die Antwortmodulation ΔA_0 in Abhängigkeit von der Wellenlänge, also einmal beim Reiz ΔQ_1 und ein andermal bei ΔQ_2 .

$$\Delta A_0 = k_1 \Delta Q_1$$

$$\Delta A_0 = k_2 \Delta Q_2$$

Bei verschiedenspektralen Reizen ist die jeweils notwendige Modulationsstärke gleich:

$$\Delta Q_1 = \Delta A_0 / k_1$$

$$\Delta Q_2 = \Delta A_0 / k_2$$

Die Frage nach der Empfindlichkeit des Systems ist die Frage nach der jeweilig notwendigen Quantenmodulation bei einer bestimmten Wellenlänge oder nach der wellenlängenabhängigen Steilheit der Reiz-Antwort-Zusammenhänge:

$$f_{\lambda_2/\lambda_1} = \Delta Q_2 / \Delta Q_1 = k_1 / k_2$$

(f sagt aus, wievielmals empfindlicher das System auf Reize der Wellenlänge λ_2 im Vergleich zu λ_1 ist.)

Man führt den Kehrwert von f ein: $S(\lambda_2/\lambda_1)$, so daß bei steigender Empfindlichkeit das Maß dafür ebenfalls steigt:

$$S(\lambda) = 1/f = k_2/k_1$$

Bezieht man nun alle λ_i auf ein λ_1 , so erhält man eine Kurve, die ein Maß ist für die relative, wellenlängenabhängige, intensitätsunabhängige Antwortverteilung: die spektrale Empfindlichkeit.

Bei FIS erhält man nach der Korrektur des "rohen" Lampenspektrums mit der Fotomultipliiereempfindlichkeit und der Umrechnung der Energie-Ordinate in eine relative Quantenzahl-Ordinate zwei zugeordnete Wertemengen:

Zum einen die spektrale Verteilung der (relativen) Quantenzahlmodulationen, zum anderen die Antwort auf diese wellenlängenverschiedenen und quantenzahlverschiedenen Reize.

Korrigiertes Lampenspektrum: $\Delta Q(\lambda)$

Rohes Antwortspektrum: $\Delta A(\Delta Q(\lambda))$

Das heißt:

Δu Quanten λ_1 führen zur Antwort: ΔA_1

Δv Quanten λ_2 führen zur Antwort: ΔA_2

Δw Quanten λ_3 führen zur Antwort: ΔA_3

etc.

Die wellenlängenabhängige Steigung der Reiz-Antwort-Zusammenhänge findet man durch Division von Antwort durch Reiz (z.B. $\Delta A_2/\Delta v$): k_1, k_2, k_3 usw.

Bezieht man sich auf eine Wellenlänge, z.B. diejenige mit der relativ höchsten Steigung k (Skalieren auf das Maximum), so erhält man die spektrale Empfindlichkeit des Systems.

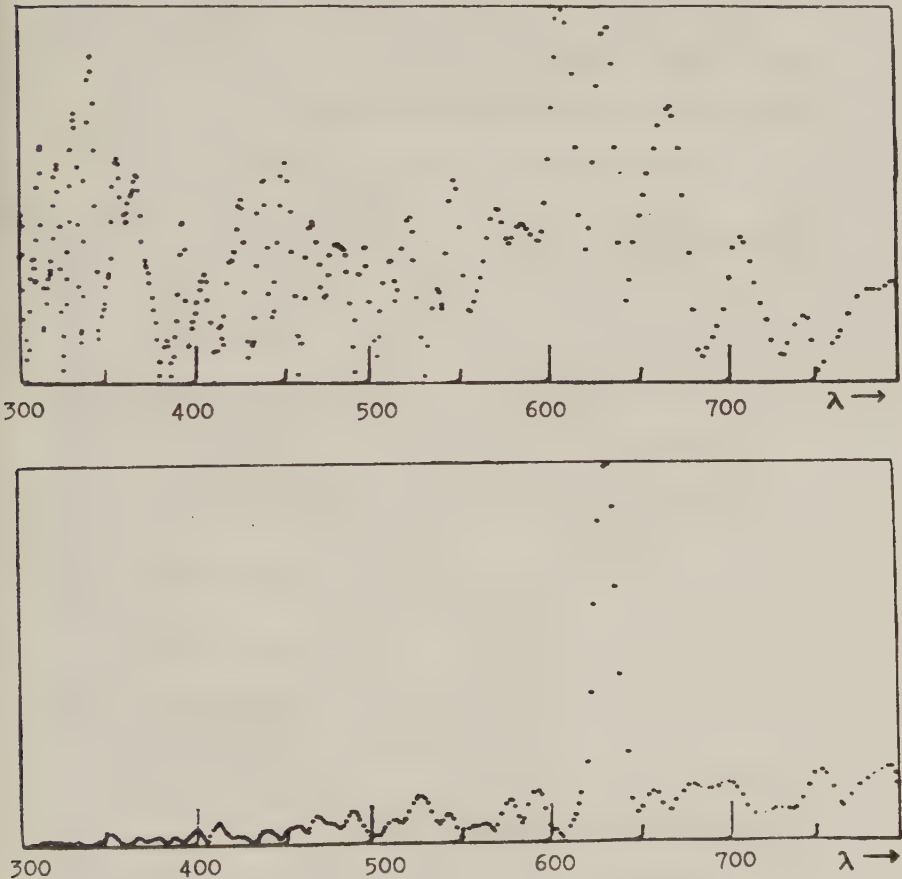
Warum die Kennlinien der Sehzellen von Calliphora bei unterschiedlicher Reizung verschieden sind (linear bzw. logarithmisch), ist nicht geklärt. Bei einem Porenmodell der Sehzelle ist der Ionenfluß, der Strom, proportional zur Quantenmenge. Dieser Zusammenhang ist also linear. Die Spannung über der Membran vor und nach der eingestrahnten Quantenmenge ist in einem logarithmischen Verhältnis zum Reiz (Nernstsche Gleichung). Nach Ansicht des Verfassers liegt darin vielleicht ein Hinweis auf die Ursache für die unterschiedlichen Kennlinien, wenn man zusätzlich die Art der Potentialbestimmung der Sehzellen berücksichtigt. Ein Fotoelement verhält sich interessanterweise bezüglich der Kennlinien ähnlich wie eine Sehzelle. Der Strom ist proportional zur Intensität, die Spannung steht in einem logarithmischen Verhältnis zu dieser.

Bei unseren dynamischen Messungen ist es also nicht nötig, neben der Spektralmessung noch eine Kennlinie zu bestimmen. Die Division der Antwort durch die relative Quantenzahl des Reizes führt direkt zur spektralen Empfindlichkeit.

Ein weiterer Vorteil des modulierten Reizes ist darin zu sehen, daß die Messung auf einem bestimmten Adaptationsniveau erfolgt. Übersteuerungen und das Auftreten unerwünschter Nichtlinearitäten sind weniger wahrscheinlich als bei anderen Reizformen.

Schließlich gibt es auch noch einen technischen Vorteil der Sinusstimulation: Das Rauschen läßt sich wesentlich bes-

ser vom Signal abtrennen als bei der Rechteckreizung. Da man die Reiz- und damit auch die Antwortfrequenz kennt, lassen sich durch geeignete Wahl von Hoch- und Tiefpässen die meisten nicht reizzugehörigen Antwortbestandteile entfernen. Das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert sich bedeutend (Abb.1.1.4).

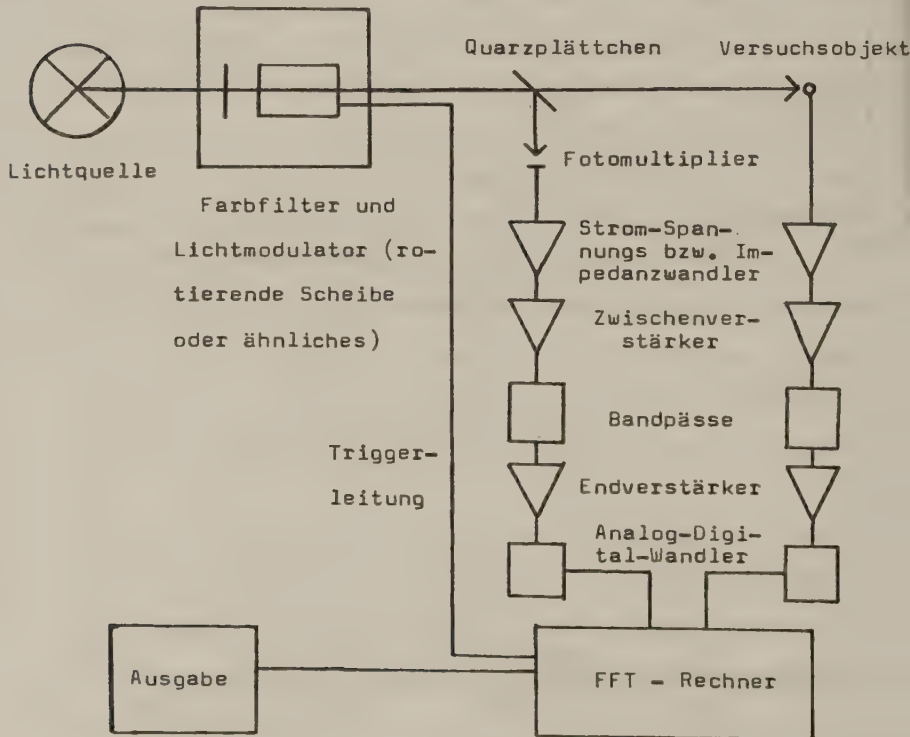


1.1.4 Bestimmung eines Spektrums ohne und mit Filterung

Die Abbildungen zeigen FIS-Messungen des Laserlichtes $\lambda = 632,8 \text{ nm}$. Die einzelnen Punkt sind echte Meßpunkte. Das

abgeschwächte Laserlicht wurde elektrisch mit dem Signal eines Rauschgenerators gemischt. Bei der oberen Abbildung wurden die Pässe weit gestellt (Bandpaß: 0,9 Hz - 500 Hz). Bei der unteren Abbildung wurde weitgehend nur das mit 4,6 Hz modulierte Laserlicht herausgefiltert (Bandpaß: 4 - 5 Hz).

Wie sähe nun ein Versuchsaufbau zur Bestimmung der spektralen Empfindlichkeit mit Hilfe sinusförmiger Stimulation aus? Abbildung 1.1.5 soll dies zeigen.



1.1.5 Theoretischer Versuchsaufbau zur Bestimmung der spektralen Empfindlichkeit mit Sinusreizen

Die Bestimmung von Reiz- und Antwortamplitude würde durch einen Computer via Fourieranalyse erfolgen. Die Fourieranalyse hat gegenüber einem direkten Verfahren den Vorteil der Trennung der Grundschwingung von den höheren Nichtlinearitäten. Weiter lassen sich Antwort und Rauschen stärker voneinander trennen. Letztendlich ergibt sich bei der Fourieranalyse mehrerer Perioden ein Mittelungseffekt (siehe Fritz 1977).

In Abhängigkeit vom Frequenzgang des Untersuchungsobjektes würde man eine möglichst antwortstarke Reizfrequenz suchen, und zur Rauschverminderung würde das Signal noch durch Bandpässe gefiltert.

Der entscheidende Schritt von dem skizzierten Verfahren zur fourierinterferometrischen Stimulation besteht nun darin, daß nach einer Idee von Dr. R. Gemperlein der in der Abbildung 1.1.5 umrandete spektrale Modulator durch ein Michelson-Interferometer ersetzt wird.

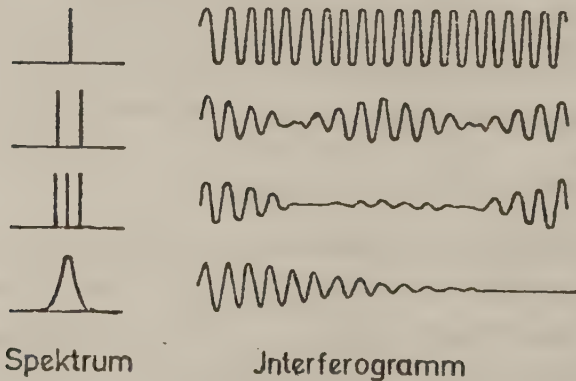
Verwendung eines Michelson-Interferometers - Vorteile der Fourierspektroskopie bzw. der fourierinterferometrischen Stimulation:

Für die nun folgenden Erläuterungen genügt es, ein Michelson Interferometer als "Black Box" zu verstehen, deren Input Licht einer bestimmten spektralen Zusammensetzung ist (z.B. das Licht einer Xenon-Hochdrucklampe). Der Output enthält weiter alle spektralen Elemente der Lampe mit dem wesentlichen Unterschied, daß jedes einzelne Element mit einer genau festgelegten Frequenz sinusförmig bzw. in diesem Fall besser cosinusförmig moduliert wird (siehe Kapitel 1.3).

Aus den einzelnen "statischen" spektralen Teilen des Lichtes werden cosinusförmig modulierte Spektrallichter. Der Gesamtoutput ist die unendliche Summe der mit jeweils verschiedener Frequenz cosinusförmig modulierten einzelnen spektralen Bestandteile des Lichtes. Beim Input "weißes" Licht würde im Output z.B. ein Rotbestandteil $\lambda = 700 \text{ nm}$ mit 2 Hz, ein anderer Bestandteil $\lambda = 500 \text{ nm}$ mit 2,8 Hz und ein dritter UV-Bestandteil $\lambda = 350 \text{ nm}$ mit 4 Hz moduliert werden.

Wellenlänge und Frequenz sind also zueinander umgekehrt proportional.

Verschiedene Spektren als Input und die zugehörigen Interferogramme (von der Weißlichtposition ab; siehe dazu Kapitel 1.3) als Output zeigt die folgende Abbildung 1.1.6.



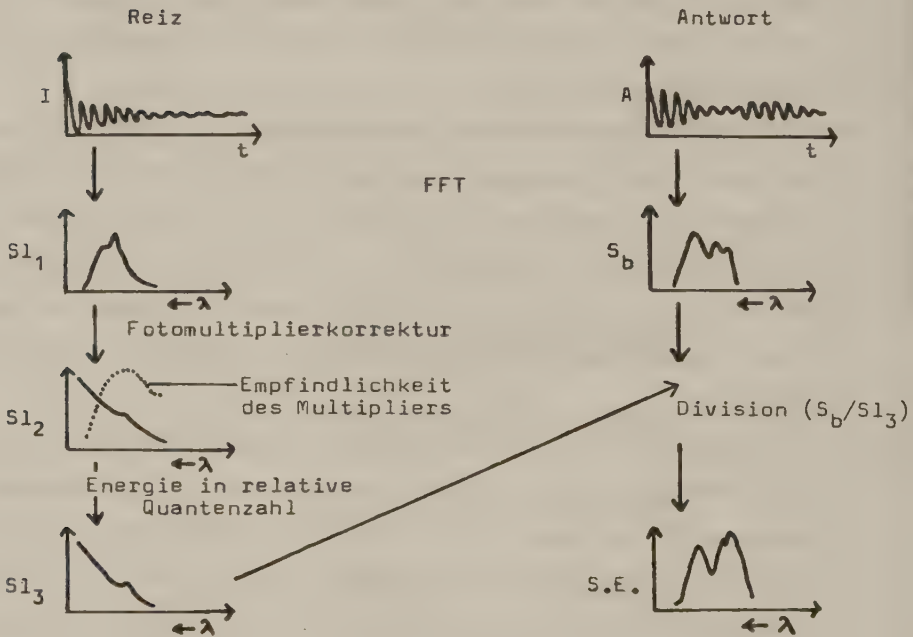
Bei einem monochromatischen Input besteht der Output aus einem cosinusförmig modulierten Licht. Bei Linienlampen mit wenigen Spektralelementen erhält man die Superposition weniger Cosinusschwingungen, also eine Schwebung. Bei Lampenspektren mit unendlich vielen Komponenten besitzt das Interferogramm ein ausgeprägtes Maximum, die sogenannte Weißlichtposition, wo alle cosinusförmigen Modulationen in Phase sind. Je weiter man sich von dieser Position entfernt, desto geringer werden die Modulationen des Gesamtsignals (weitere Ausführungen zum Thema Interferogrammform finden sich in Kapitel 1.3, Abschnitt d).

Verwendet man nun diese Interferogramme als Reiz für Sehzellen, so erhält man als Reaktion sogenannte Antwortinterferogramme. Die jeweilige Form hängt von der Beurteilung der einzelnen spektralen Elemente ab. Je nach Art des Sehfärbstoffes der Zelle(n) wird z.B. der Rot- oder UV-Bestandteil des Antwortinterferogramms im Vergleich zum Reizinterferogramm erhöht sein.

Praktisch ist die Vorgehensweise folgende: Reiz und Reaktion werden parallel aufgezeichnet und dann via Fourieranalyse spektral untersucht. Man erhält ein rohes Lampen- und Antwortspektrum, aus dem man ersieht, daß die Zelle auf eine Schwingung von 2 Hz mit einer Antwort a_1 und auf eine Schwingung von 4 Hz mit a_2 reagiert hat. Da man aber weiß, daß der 2 Hz-Schwingung $\lambda = 700 \text{ nm}$ und der anderen $\lambda = 350 \text{ nm}$ zugeordnet waren, kennt man nun die Reaktion der Zelle auf spektral verschiedene Cosinusschwingungen. Der Einfluß des Fre-

quenzganges auf die Reaktion der Zelle wird am Ende dieses Kapitels erörtert.

Das "rohe" Lampenspektrum wird noch bezüglich der spektralen Empfindlichkeit des Fotodetektors korrigiert sowie die Energie-Ordinate des Spektrums in eine Quanten-Ordinate umgerechnet. Die Division des Antwortspektrums durch das korrigierte Lampenspektrum liefert die spektrale Empfindlichkeit.



1.1.7 Verrechnungsschema

Was sind nun die Vorteile der Verwendung eines Michelson-Interferometers ?

Der Interferogrammreiz besteht aus unendlich vielen spektralen Elementen, die alle mit verschiedener Frequenz cosinusförmig moduliert werden. Es wird mit allen spektralen Elementen der Lampe gleichzeitig gereizt. Der Reiz besteht aus Modulationen um ein mittleres Intensitätsniveau herum. Von der Zelle aus gesehen befindet man sich auf einem festgelegten Adaptationsniveau.

Im Output sind alle spektralen Elemente gleichzeitig vorhanden. Bei sequentieller Reizung steht die Zeit t_1 zur Reizung zur Verfügung. Man erhält in dieser Zeit die Reaktion auf ein bestimmtes spektrales Element. Das Signal-Rausch-Verhältnis hängt direkt mit dieser Zeit zusammen. Je länger man reizt und mittelt, desto besser ist das Signal-Rausch-Verhältnis. Für n spektrale Elemente benötigt man die Zeit $t_2 = n \cdot t_1$. Bei paralleler Reizung wie bei FIS steht diese Zeit t_2 für alle n Elemente zur Verfügung. Das Signal-Rausch-Verhältnis ist also um eine Funktion von n besser.

Diese in der Fourierspektroskopie MULTIPLEX-Vorteil genannte Verbesserung gegenüber herkömmlichen Verfahren gilt auch für die fourierinterferometrische Stimulation.

Die spektrale Auflösung bei der Verwendung von Interfe-

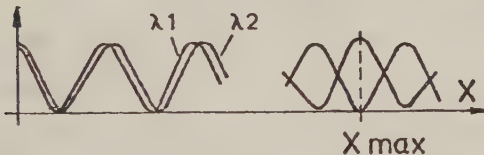
renzfiltern ist durch deren Halbwertsbreite und Anzahl festgelegt. Bei Verwendung eines Monochromators sinkt bei steigender Auflösung rasch die Lichtstärke, da die Eintritts- und Austrittsöffnung aus Abbildungs- und Auflösungsgründen sehr schmal gemacht werden muß.

Bei FIS ist hohe Auflösung und hohe Lichtstärke gleichzeitig möglich. Dies nennt man den LICHTSTÄRKE-Vorteil der Fourierspektroskopie.

Die einzelnen spektralen Elemente der Lampe werden durch eine geeignete Interferenzanordnung cosinusförmig moduliert. An den Minima/Maxima findet Lichtauslöschung oder Lichterhaltung statt. Die Bestimmung der Wellenlänge eines spektralen Elements ist durch die ihm zugeordnete einzigartige Frequenz möglich. Es ist also nicht notwendig, wie beim Monochromator oder bei Interferenzfiltern die anderen Wellenlängen auszublenden, um eine wohldefinierte Wellenlänge als Reiz zu besitzen, sondern aus dem Gemisch aller verschiedenen cosinusförmig modulierten spektralen Elemente ist jedes einzelne aufgrund seiner Kennung, seiner spezifischen Frequenz, identifizierbar. Eine Lichtabschwächung durch schmale Ein- oder Austrittsblenden ist nicht vorhanden. Die Intensität und die Leuchtfläche am Eingang bleiben weitgehend bis zum Ausgang erhalten, da weder aus Abbildungs- noch aus Auflösungsgründen eine Lichtverminderung bzw. -selektion notwendig ist. Die Auflösung ist hoch, ohne daß dafür viele schmalbandige Interferenzfilter verwendet werden müssen, deren Auflösung durch ihre Halbwertsbreite beschrieben ist.

Bei der Fourierspektroskopie ist die Frage nach der Auflösung die Frage nach der Trennbarkeit zweier ähnlichfrequenter Schwingungen. Nach Rayleigh ist eine Trennung zweier Schwingungen dann erfolgt, wenn nach x Perioden eine Phasendifferenz von 180° auftritt.

Diese Definition ist zwar etwas willkürlich, aber als Anhaltspunkt brauchbar. Der cosinusförmige Output des Interferometers entsteht bei der Bewegung eines Spiegels, und die Auflösung und der Fahrweg dieses Spiegels hängen bei der FIS miteinander zusammen. Nach einer bestimmten Fahrstrecke s interferieren λ_1 und λ_2 destruktiv (Position $x_{\max}$).



1.1.8 Auflösung nach Rayleigh (aus Parsche 1973)

Bei unseren Interferometern ist nach dieser Definition momentan eine Auflösung von maximal 0,5 nm möglich.

Übliche Halbwertsbreiten von Interferenzfiltern liegen bei 20 bis 30 nm.

Statt wie üblich mit 20 Interferenzfiltern wird bei der FIS der Bereich von 300 nm bis 700 nm mit ca. 300 Spektralmeßpunkten abgedeckt. Diese Anzahl hängt von der jeweiligen Rayleigh-Auflösung und der Größe der Fouriertransformation ab.

Ein weiterer Vorteil der FIS ist die Schnelligkeit der

Messung. Um ein gleich großes Signal-Rausch-Verhältnis wie bei der sequentiellen Rechteckmethode zu erzielen, benötigt man eine wesentlich geringere Zeit (t_1 statt $t_2 = n \cdot t_1$).

Zudem fallen die Zeiträume weg, die bei der Rechteckmethode zur Dunkeladaptation des Versuchsobjekts benötigt werden. Die Bestimmung der spektralen Empfindlichkeit durch FIS kann also wesentlich schneller als bei früheren Methoden erfolgen.

Übliche Meßzeiten bei dieser Arbeit lagen im Sekundenbereich. Meßzeiten unter einer Sekunde sind möglich. Wurden aus Gründen der Präzision viele Antworten gemittelt, lagen die Meßzeiten im Bereich weniger Minuten.

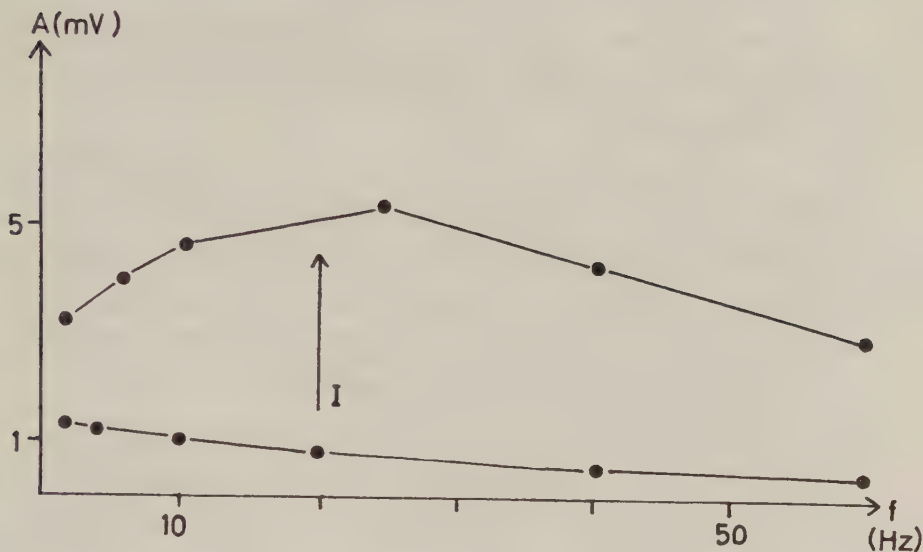
Ein weiterer Vorteil von FIS im Vergleich zu früheren Methoden ergibt sich daraus, daß Reiz und Reaktion immer parallel aufgezeichnet und verrechnet wurden. Fluktuationen der Lampe oder mögliche Veränderungen von Farbfiltern vor dem Interferometer spielen keine Rolle, da der jeweilige Reiz mitbestimmt wird!

Die eindeutige Frequenz-Wellenlängen-Zuordnung ergibt sich aus der gleichzeitigen Einspiegelung und Verrechnung des Lichtes eines Helium-Neon-Lasers. Dessen monochromatisches Licht mit $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ führt zu einer eindeutig festgelegten Modulationsfrequenz. So läßt sich präzise die Zuordnung der Wellenlänge zur Frequenz bestimmen.

FIS, der Frequenzgang und die Nichtlinearität der biologischen Objekte:

Verschiedenfrequente Reize können zu verschiedenen Antwort-

amplituden führen.



1.1.9 Frequenzgang von Sehzellen (nach Smola u. Gemperlein 1972)

Theoretisch muß man also bei FIS den Frequenzgang des zu untersuchenden Systems bestimmen und an der spektralen Empfindlichkeit eine entsprechende Korrektur anbringen.

Die Bestimmung des Frequenzganges kann mit einem modulierten Weißlichtreiz erfolgen, dessen Intensität gleich der mittleren Intensität des Interferogramms ist.

Aus versuchstechnischen Gründen konnte dieser Vortest bislang nicht stattfinden. Aufgrund früherer Daten (u.a. Smola u. Gemperlein 1972, Zettler 1969, Kuiper u. Leutscher-Hazelhoff 1965, Fritz 1977) gingen wir davon aus, daß der Amplitu-

den-Frequenzgang im Spektraltestbereich weitgehend als konstant anzusehen ist. Die in dieser Arbeit aufgeführten Messungen wurden zwischen 2 und 4 Hz bzw. zwischen 4,6 und 9,2 Hz durchgeführt.

Die Deckungsgleichheit der gemessenen spektralen Empfindlichkeit mit dem Dartnall-Nomogramm (Kapitel 2.2) und die große Stabilität der Messungen bestätigen neben anderem, daß diese Annahme meist berechtigt war. Der Frequenzgang kann aber ohnehin nur zu einer im Spektralbereich gleichförmigen Verstärkung oder Abschwächung führen.

Als letztes sei das Problem der Nichtlinearität erörtert. Es wurde weiter oben davon gesprochen, daß neben der dominierenden, zum Reiz in proportionaler Beziehung stehenden Grundantwort höhere harmonische Schwingungen auftreten. Deren Anteil beträgt bei unseren Messungen ca. 5 % der Grundschiwingung.

Bei einer Modulationsfrequenz von 2 Hz bei $\lambda = 632,8$ nm und von 4 Hz bei $\lambda = 316,4$ nm liegen die ersten harmonischen Schwingungen zwischen 4 und 8 Hz für Wellenlängen zwischen 632,8 nm und 316,4 nm. Die Nichtlinearitäten finden sich also in anderen Frequenzbereichen als die spektralen Empfindlichkeiten. Sie beeinflussen sie nicht.

Da Nichtlinearitäten in anderen Frequenzbereichen zu finden sind als die spektralen Empfindlichkeiten, ließen sich selbst hypothetische Systeme, die z. B. im Extremfall auf Cosinusschwingungen mit Rechteckschwingungen antworten würden, mit FIS untersuchen. Ein Rechteck läßt sich fourieranalytisch in eine Summe verschiedenfrequenter Schwingungen zerlegen. Die

Antwort mit gleicher Frequenz wie der Reiz liegt immer als Cosinusschwingung vor.

Form und Betrag der Nichtlinearität sind eventuell sogar von großer Bedeutung bei der Analyse des Systems (siehe Kapitel 2.2).

Der Betrag der ersten, zweiten usw. harmonischen Schwingung ermöglicht eventuell Aussagen über die Art der Nichtlinearität. Die Form der Nichtlinearität könnte z.B. Aufschluß darüber geben, ob man es mit einem oder mehreren Untersystemen zu tun hat, die Farbe verschieden verarbeiten.

Es wäre sogar möglich, bei vorherigem Ausschluß von einzelsystembedingten nichtlinearen Abweichungen Aussagen über Verrechnungsmodi der Spektralinformation zu machen.

1.2 Zur UV-Empfindlichkeit der Insekten

Mit Hilfe der von Karl von Frisch entwickelten Dressurmetho-
den (von Frisch 1914) gelang A.Kühn der Nachweis, daß ultra-
violett Licht für Bienen eine eigene Reizqualität dar-
stellt (Kühn 1927). Bei Verhaltensexperimenten war schon frü-
her die UV-Empfindlichkeit von Ameisen beobachtet worden (Lub-
bock 1883). Extrazelluläre Ableitungen zeigten später diese
auch für *Calliphora erythrocephala* und *Periplaneta america-*
na (Walther und Dodt 1959). Als Grundlage für diese Empfind-
lichkeit konnte bei manchen Insekten, so bei *Ascalaphus* (Ham-
dorf, Paulsen, Schwemer und Täuber 1972), ein Rhodopsin mit
einem Maximum im Ultravioletten identifiziert werden. Bei *Cal-*
liphora wurde durch intrazelluläre Ableitungen und Zellfär-
bungen gezeigt, daß die spektrale Empfindlichkeit sich auf die
verschiedenen Rezeptortypen eines Ommatidiums unterschiedlich
verteilt. Die Gruppe R1-6 besitzt eine einheitliche Empfind-
lichkeit mit zwei Maxima bei 490 nm und 350 nm (u.a. Burkhardt
1962, Meffert 1977). Die restlichen zwei Rezeptortypen R7 und
R8 zeigen unterschiedliche Empfindlichkeiten, so z.B. rein im
Ultravioletten oder im Blauen (u.a. Smola und Meffert 1979).

Nur die Empfindlichkeit des Typs R1-6 soll im weiteren dis-
kutiert werden. Als für die Empfindlichkeit im Sichtbaren ver-
antwortliche Substanz konnte ein Rhodopsin mit einem Maximum
um 490 nm identifiziert werden (u.a. Langer und Thorell 1966).

Dagegen ist bis heute nicht klar, woher die Empfindlich-
keit im Ultravioletten kommt. Als Ursache wurde der β -Peak
des Rhodopsins, Fluoreszenz und ein zweites Pigmentsystem dis-

kutiert (u.a. Goldsmith und Fernandez 1968, Horridge und Mura 1975 und Rosner 1975). Fluoreszenz, hier also die Abstrahlung von sichtbarem Licht nach der Absorption im UV durch ein Hilfspigment, ist u.a. wegen der teils höheren Reaktionsfähigkeit im Ultravioletten als im Sichtbaren nicht als Erklärung tauglich. Der β -Peak des Rhodopsins ist wesentlich kleiner als die beobachtete UV-Empfindlichkeit. Zudem läßt sich durch die Fütterung mit Vitamin-A-armer bzw. -reicher Kost das Verhältnis der UV-Empfindlichkeit zu der im Sichtbaren verschieben (Stark, Ivanyshyn und Greenberg 1977, Kuo 1979). Gegen die Zwei-Pigment-Hypothese sprechen chromatische Adaptationsexperimente (Burkhardt 1962, Tsukahara und Horridge 1977).

Die wahrscheinlichste Erklärung für die hohe UV-Empfindlichkeit ist die Annahme eines Zusatzpigmentes, das die absorbierte Energie direkt auf das Rhodopsin überträgt (Kirschfeld, Franceschini und Minke 1977).

Die vorliegende Arbeit stützt stark diese These, da eine bisher nicht beobachtete Feinstruktur der UV-Empfindlichkeit bei *Calliphora* demonstriert werden konnte, deren Ursache wahrscheinlich ein Polyen mit 5 konjugierten Doppelbindungen ist. Eine Diskussion mit Professor Oesterheld vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München läßt ein Retinolderivat (Retrorretinol) als Ursache für die UV-Empfindlichkeit möglich erscheinen.

Zur Satellitenpigment-Hypothese führten folgende Beobachtungen (siehe Kirschfeld et al. 1977). UV-Licht führt zum selben Metarhodopsin wie Bestrahlung mit blauem Licht. Dabei nimmt

aber die Extinktion im UV nicht ab. Weiter kann am absoluten Extinktionsspektrum gezeigt werden, daß das UV-Maximum durch Belichtung nicht beeinflusbar ist. Weitere Beweise ergaben sich aus der Beobachtung des M-Potentials, dessen Höhe eng mit dem Metarhodopsin-Pegel zusammenhängt (u.a. Pak und Lidington 1974). Falls die Energie, die im Ultravioletten absorbiert wird durch direkte Übertragung (Förster-Kopplung) auf das Rhodopsin gegeben wird, sollte dieser Vorgang von der Konzentration der Partner bzw. von ihrer mittleren Entfernung abhängig sein. Bei Fliegen mit reduzierter Rhodopsin-Konzentration war die Wirksamkeit der Metarhodopsin-Entstehung, gemessen am M-Potential, bei ultravioletter Belichtung geringer als bei blauer. Es zeigt sich zudem, daß die Kinetik der Abnahme der Rhodopsinkonzentration bei steigender Quantenzahl nur bei blauer Belichtung eine Reaktion 1. Ordnung zeigte, während die UV-Belichtung der Vitamin-A-arm ernährten Fliegen von solch einer Relation abwich. Weitere Unterstützung erfuhr die Hypothese durch die Beobachtung, daß Metarhodopsin einen hohen UV-Peak hat, wie es die Theorie wegen der Überlappung des Metarhodopsin-Spektrums mit dem des Hilfspigments vorhersagt (Minke und Kirschfeld 1979).

Daß Hilfspigmente, ähnlich wie bei photosynthetisch aktiven Strukturen, auch beim Sehvorgang wichtige Funktionen übernehmen, ist weiter durch das Vorhandensein eines Zusatzpigments im Rezeptor R7 belegt (Kirschfeld, Feiler und Franceschini 1978). Hier handelt es sich wahrscheinlich um ein Carotenoid.

Obwohl noch nicht geklärt ist, ob die Energieübertragung durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung zweier freier Moleküle oder durch elektrische Übertragung der Energie von einer zweiten, an das Rhodopsin angehefteten Chromophore zustandekommt, soll hier kurz auf den Mechanismus der Förster-Kopplung (Förster 1951) eingegangen werden. Die Beobachtung, daß die Sehzellen R1-6 im UV im Gegensatz zum Sichtbaren keine Polarisationsempfindlichkeit zeigen (u.a. Kuo 1979), spricht für diese Übertragungsart. Bei einer präzisen sterischen Anheftung der Chromophore an das Rhodopsin wäre auch eine Polarisationsempfindlichkeit im UV zu erwarten.

Die Energieübertragung nach Förster läßt sich wie folgt erklären (nach H.Kuhn 1977):

Licht einer bestimmten Frequenz wird vom Molekül M1 absorbiert. Neben der Abgabe eines geringen Teils der Energie in Form von Schwingungsenergie kann der Rest durch Fluoreszenz oder durch Übertragung auf ein in der Nähe befindliches Molekül M2 abgegeben werden. M1 wird dabei als schwingender Dipoloszillator betrachtet, der wie eine Antenne elektromagnetische Strahlung aussendet. Beim klassischen Modell würde M1 einen Teil der Leistung kontinuierlich aussenden (W_1) und einen anderen Teil auf M2 übertragen (W_2). Bei der quantenmechanischen Betrachtung gibt es eine Entweder-Oder-Entscheidung. Die Wahrscheinlichkeit des jeweiligen Weges wird durch W_1 bzw. W_2 angegeben. Diese Werte lassen sich auch klassisch berechnen.

Man geht von einem Dipoloszillator M1 aus, der mit der Fre-

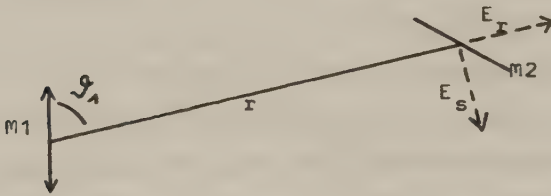
quenz ν und der Amplitude x_{10} schwingt. Im Abstand r von diesem herrschen in Richtung von r und senkrecht dazu folgende Feldstärken (Gl.1.2.1 a/b) :

$$E_r = 2e_1 x_{10} \cos \varphi_1 \left(\frac{1}{n^2 r^3} \cos(\omega(t-rn/c)) - \frac{\omega}{ncr^2} \sin(\omega(t-rn/c)) \right)$$

und

$$E_s = e_1 x_{10} \sin \varphi_1 \left(\left(\frac{1}{2r^3} - \frac{\omega^2}{c^2 r} \right) \cos(\omega(t-rn/c)) - \frac{\omega}{ncr^2} \sin(\omega(t-rn/c)) \right)$$

(c : Lichtgeschwindigkeit, e_1 : Ladung von M1, n : Brechungsindex des dielektrischen Mediums, ω : Kreisfrequenz, t : Zeit)



1.2.1 Feldstärke von M1 am Ort des Absorbers M2

Die mittlere Fluoreszenzleistung von M1 ($=W_1$) ist die mittlere Strahlungsleistung, die man sich durch die Oberfläche einer um M1 gelegenen Kugel des Radius r emittiert denken kann:

$$W_1 = \int_{\text{Kugel\,fl\ddot{a}che}} I dO \quad (\text{Gl.1.2.2})$$

(I : Intensität des Fluoreszenzlichtes, dO : Flächenelement auf der Kugel)

Die Gleichung 1.2.4 zeigt den Zusammenhang zwischen der Intensität I und der Amplitude E_0 der Feldstärke E , die aus Gl.1.2.1 unter Vernachlässigung der Glieder $1/r^2$ und $1/r^3$ folgt. Die Messung des Fluoreszenzlichts erfolgt in großer Entfernung r ! Die Gleichung für E lautet (Gl.1.2.3) :

$$E = E_0 \cos(\omega(t - rn/c)) \quad \text{mit} \quad E_0 = - \frac{e_1 x_{10} \omega^2}{c^2 r} \sin \theta_1$$

und

$$I = \frac{cn}{8\pi} E_0^2 \quad (Gl.1.2.4)$$

Durch Einsetzen von 1.2.3b und 1.2.4 in 1.2.2 und nach Auflösung des Integrals erhält man die Gleichung 1.2.5 :

$$\omega_1 = \frac{e_1^2 x_{10}^2 \omega^4 n}{3c^3}$$

Ein Molekül M2 sei nun von Licht der Frequenz ω bestrahlt. M2 tritt nur mit dem Teil des elektrischen Vektors in Wechselwirkung, der in einer bestimmten Richtung (Richtung des Übergangsmomentes) zum Molekül schwingt ($=E_0$). Die im Zeitmittel von M2 absorbierte Leistung zeigt die Gleichung.1.2.6 :

$$\omega_2 = \alpha E_0^2$$

Die Proportionalitätskonstante α steht im Zusammenhang mit dem molaren Extinktionskoeffizienten ϵ .

Bringt man ein Molekül M2 in die Nähe des Moleküls M1, so befindet es sich im Feld von M1, das durch die Gleichung 1.2.1 beschrieben ist. Bei genügend kleinem r braucht man nur noch die Glieder mit $1/r^3$ berücksichtigen. Bei beliebiger Orientierung der zwei Moleküle ist für die Amplitude des Feldes E_0 die Gleichung 1.2.7 gültig:

$$E_0 = \frac{e \cdot 10}{n^2 r^3} K \text{ mit } K = 2 \cos \vartheta_1 \cos \vartheta_2 - \sin \vartheta_1 \sin \vartheta_2 \cos \xi$$

(ϑ_2 : Winkel zwischen r und dem Übergangsmoment von M2, ξ : Winkel zwischen den Ebenen von ϑ_1 und ϑ_2)

Die von M2 im Mittel aus dem Feld von M1 entnommene Leistung errechnet sich aus 1.2.7 und 1.2.6 und führt zur Gleichung 1.2.8:

$$W_2 = \alpha \left(\frac{e \cdot 10}{n^2 r^3} K \right)^2$$

Die entnommene Leistung ist also proportional zu r^{-6} . Es läßt sich zeigen, daß für den Fall $W_1 = W_2$ (50% Fluoreszenz, 50% direkte Energieübertragung) der Abstand r um 5 nm liegt.

Bei einer genaueren Betrachtung muß noch die thermische Energieabgabe und die Verbreiterung der Fluoreszenzbande berücksichtigt werden.

Jedenfalls erfolgt der Energieübergang auf ein anderes Molekül über das elektromagnetische Feld des strahlenden Dipols und die Übergangswahrscheinlichkeit hängt stark vom Abstand r der zwei Moleküle ab.

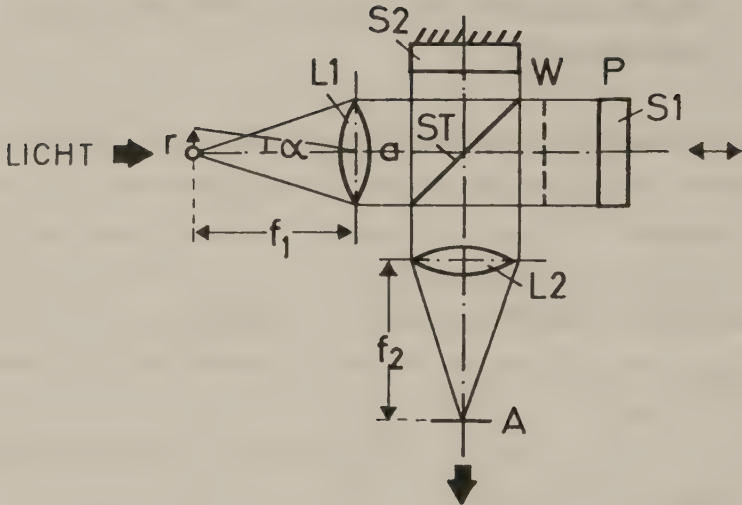
1.3. Mathematisch-physikalische Grundlagen der Fourier-spektroskopie

Die im folgenden erläuterten Grundlagen der Fourierspektroskopie (FSP) sind auch für die fourierinterferometrische Stimulation (FIS) gültig. Bei der FSP wird Licht mit einem Michelson-Interferometer auf seine spektrale Zusammensetzung hin analysiert, bei der FIS wird mit Hilfe eines Michelson-Interferometers ein neuartiger spektraler Reiz erzeugt.

Das Licht aus einer monochromatischen Punktlichtquelle, die sich auf der Achse a befinden soll, tritt durch die Linse L_1 in das Interferometer ein (siehe Abb. 1.3.1.). Am Strahlenteiler ST, dessen Reflexions- und Transmissionsvermögen durch r und t beschrieben ist, wird der einfallende Strahl $A_0 = A e^{i(\omega t - 2\pi x/\lambda)}$ in zwei Teilstrahlen A_1 und A_2 zerlegt, wobei einer in Einfallrichtung, der andere senkrecht dazu den Weg zu den Spiegeln S_1 bzw. S_2 zurücklegt. Die Strahlen werden reflektiert, kehren über denselben Weg zurück und vereinigen sich am Strahlenteiler zum Ausgangsstrahl $A' = A(rt) (e^{i(\omega t - 2\pi x_1/\lambda)} + e^{i(\omega t - 2\pi x_2/\lambda)})$.

x_1 und x_2 sind die von den zwei Lichtbündeln zurückgelegten Wege. Die Energie, die einen Detektor nach dem Verlassen des Interferometers erreicht, beträgt $E = |A'|^2$.

Nach dem Quadrieren, dem Vereinfachen nach den Regeln für komplexe Zahlen und dem Weglassen des imaginären An-



1.3.1 Michelson-Interferometer mit optischer Abbildung

teils erhält man den Ausdruck:

$$E = 2A^2 |rt|^2 (1 + \cos(2\pi(x_1 - x_2)/\lambda))$$

Mit den Symbolen x für die Wegdifferenz $(x_1 - x_2)$, E für $|rt|^2$ und dem Ausdruck $B(1/\lambda)d(1/\lambda)$ anstatt A^2 für die Intensität des Spektrums $B(1/\lambda)$ im Differential $d(1/\lambda)$ erhält man folgende Gleichung:

$$E = 2EB(1/\lambda) (1 + \cos(2\pi x/\lambda)) d(1/\lambda)$$

Als Interferogramm bezeichnet man den sich mit x verändernden Teil von E :

$$dI(x) = 2EB(1/\lambda) (\cos(2\pi x/\lambda)) d(1/\lambda)$$

Für monochromatisches Licht erhält man also bei sich veränderndem Weg x eine cosinusförmige Lichtmodulation am Ausgang des Interferometers!

Die Frequenz f dieser Modulation und die Wellenlänge λ des eingestrahnten Lichts sind über die Spiegelgeschwindigkeit ineinander überführbar.

$$f = v/\lambda$$

Die obigen Gleichungen hätten sich also auch mit f oder mit $\sigma = 1/\lambda$ schreiben lassen können.

Für polychromatisches Licht ist das Interferogramm die Summe der Einzelschwingungen der spektralen Elemente $d\sigma$.

$$I(x) = 2\epsilon \int_{-\infty}^{\infty} B(1/\lambda) (\cos(2\pi x/\lambda)) d(1/\lambda) \quad (1)$$

Man kennt nun in der Mathematik sogenannte Fouriertransformationspaare:

$$f(x) = \int_{-\infty}^{\infty} F(\sigma) e^{i2\pi x \sigma} d\sigma \quad (2)$$

und

$$F(\sigma) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x) e^{-i2\pi \sigma x} dx \quad (3)$$

Zwei Funktionen $f(x)$ und $F(\sigma)$ lassen sich durch geeignete Operationen ineinander überführen unter der Voraussetzung, daß bestimmte, hier nicht detailliert erörterte Bedingungen (u.a. absolute Integrierbarkeit) von der Funktion $f(x)$ erfüllt werden.

Die Variablen x und σ haben die Dimensionen einer Länge oder einer inversen Länge (z.B. m oder m^{-1}).

Für die durch die Gleichung 2 oder 3 definierten Operationen existieren die Namen Fouriertransformation bzw. inverse Fouriertransformation. Als Symbole dafür gelten F.T. bzw. F.T.⁻¹. Eine Funktion $E(x)$ heißt gerade, wenn für sie gilt:

$$E(x) = E(-x)$$

Eine Funktion $O(x)$ heißt ungerade, wenn für sie gilt:

$$O(x) = -O(-x)$$

Für eine gerade Funktion $f(x)$ erhält man folgendes Fouriertransformationsspaar:

$$f(x) = \int_0^{\infty} F(\sigma) \cos(2\pi x \sigma) d\sigma \quad (4)$$

und

$$F(\sigma) = \int_0^{\infty} f(x) \cos(2\pi \sigma x) dx \quad (5)$$

Für eine ungerade Funktion erhält man ein entsprechendes Fourier-Sinus-Paar, und für nichtsymmetrische Funktionen gilt ein Sinus-Cosinus- bzw. das obere komplexe Fourierpaar (Gleichung 2 und 3).

Vernachlässigt man bei Gleichung 1 den Faktor $2E$ und ersetzt $1/\lambda$ durch σ , so erhält man:

$$I(x) \approx \int_0^{\infty} B(\sigma) \cos(2\pi x \sigma) d\sigma$$

Ein Vergleich mit Gleichung 4 ergibt, daß das Interferogramm $I(x)$ und das Spektrum $B(\sigma)$ ein Fourierpaar bilden. Durch die inverse Fouriertransformation des Interferogramms gewinnt man das Spektrum.

Es ergibt sich also folgendes Bild. Monochromatisches Licht wird durch Interferenz am Strahlenteiler in seiner Intensität verändert. In der Position W (Weißlichtposition) des Spiegels S_1 in der Abbildung 1.3.1 ist das eintretende Licht keiner Veränderung unterworfen, da die Laufstrecken für die beiden Teilstrahlen gleich sind. Bewegt man nun den Spiegel S_1 kontinuierlich von W nach P oder anders formuliert, durchlaufen die zwei Teilstrahlen verschiedene Wege, so interferieren sie am Strahlenteiler nacheinander

verstärkend und dann wieder abschwächend in Form von Cosinusschwingungen. Für die Laserwellenlänge $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ muß der Spiegel S_1 z.B. um $316,4 \text{ nm}$ bewegt werden, um eine volle Interferenzschwingung zu erzeugen. Der Spiegelweg für eine volle Interferenzperiode beträgt die halbe Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes, weil es den Weg zum Spiegel zweimal zurücklegt.

Für monochromatisches (monofrequentes) Licht ist das Interferogramm also eine Cosinusschwingung. Für polychromatisches Licht ist der Output die Summe der Cosinusmodulationen der einzelnen spektralen Elemente.

Das zugehörige Spektrum läßt sich durch Fourieranalyse des Interferogramms zurückgewinnen. Bei der FSP liefert die Analyse des Interferogramms das Spektrum des in das Interferometer eingestrahnten Lichtes. Bei der FIS wird mit dem Michelson-Interferometer ein spektraler Reiz erzeugt. Die Reaktion darauf, das Antwortinterferogramm, erlaubt die Berechnung der spektralen Empfindlichkeit des Versuchsobjekts.

Nun sollen in alphabetischer Reihenfolge wichtige Begriffe, Verfahrensweisen und Probleme der Fourierspektroskopie kurz erläutert werden. Ausführliche Darstellungen finden sich in folgenden Arbeiten, die auch als Quelle für die Erläuterungen in diesem Kapitel dienen: Bell 1972, Löwenstein 1970, Parsche 1973, Parsche und Luchner 1975.

Auflösung:

Wie schon in Kapitel 1.1 erwähnt, hängt die spektrale Auflö-

sung in der Fourierspektroskopie zusammen mit der Frage nach der Trennbarkeit zweier ähnlichfrequenter Schwingungen. Nach Rayleigh gelten zwei Schwingungen als aufgelöst, wenn sie nach einer gewissen Zahl von Perioden destruktiv interferieren, sich also auslöschen. Diese Definition ist willkürlich in dem Sinn, daß als Maß für die aufgetretene Trennung die Phasenverschiebung von 180° gilt. In Abhängigkeit vom Signal-Rausch-Verhältnis könnte man auch andere Phasendifferenzen dafür einsetzen. Tatsächlich zeigt die Praxis, daß in sehr günstigen Fällen die Auflösung nach Rayleigh um den Faktor zwei übertroffen werden kann. Als Anhaltspunkt ist die Rayleigh-Definition aber tauglich. Sie lautet:

$$\Delta \lambda = \lambda^2 / (2 x_{\max})$$

$x_{\max}$ ist die maximale Wegdifferenz der zwei Teilstrahlen. λ ist die jeweilige Wellenlänge.

Digitalisierung:

Zu Beginn dieses Kapitels wurde der analytische Weg der Spektrumsbestimmung gezeigt. In der Praxis müssen numerische Verfahrensweisen angewendet werden. Dies heißt, daß das Interferogramm durch eine bestimmte Anzahl von Meßwerten repräsentiert wird, daß ein endlicher Interferogrammteil erfaßt wird und daß nur endlich viele Spektralelemente berechnet werden. Man bestimmt also nicht das eigentliche Spektrum, sondern man macht eine Schätzung desselben. Um bei dieser Schätzung Fehler zu vermeiden, müssen die nun folgenden Bedingungen eingehalten werden.

Die Frage nach der Mindestzahl von Meßwerten zur eindeu-

tigen Repräsentation des Interferogramms beantwortet das Theorem von Shannon. Es besagt, daß die höchste vorkommende Frequenz mit mehr als zwei Werten erfaßt sein muß. Eigene Erfahrungen ließen eine Repräsentation der höchsten Frequenz mit vier Werten pro Periode als geraten erscheinen. Die Abtastung einer Funktion, die Erfassung des Meßwertes, läßt sich mathematisch durch die Delta-Funktion darstellen:

$$f(a) = \int_{-\infty}^{\infty} \delta(x-a)f(x)dx$$

mit

$$\int_{-\infty}^{\infty} \delta(x)f(x)dx = f(0) \quad \text{und} \quad \int_{-\infty}^{\infty} \delta(x)dx = 1$$

Der Gesamtvorgang der Abtastung, nämlich die Repräsentation der Funktion durch Meßwerte, läßt sich durch die Abtastfunktion (Shah-Funktion) beschreiben:

$$f'(x) = \mathcal{W}(x)f(x) \quad \text{mit} \quad \mathcal{W}(x) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \delta(x-n)$$

Die Praxis der Meßwerterfassung ist folgende. Wie erwähnt, wird das Licht eines Helium-Neon-Lasers parallel zum Reizlicht durch das Interferometer geschickt. Sein monochromatisches Licht der Wellenlänge $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ führt zu einer monofrequenten Schwingung. Diese Cosinusmodulation dient zum einen der Regelung der Spiegelposition und -geschwindigkeit (S. 55), zum anderen dient sie als Bezugspunkt für die Abtastung. Dies bedeutet, daß entweder achtmal oder sechzehnmal pro Periode dieser Wellenlänge Meßwerte entnommen werden. Somit sind die Wellenlängen $\lambda = 316,4 \text{ nm}$ bzw. $\lambda = 158,2 \text{ nm}$ mit vier Meßwerten repräsentiert und alle größeren Wellenlängen entsprechend häufiger.

Die Ableitungen zu Beginn dieses Kapitels gingen von einer unendlichen Länge des Interferogramms aus.

So ist z.B. die Repräsentation des monochromatischen Laserlichtes im Spektrum durch eine scharfe Linie nur durch die Transformation eines unendlich ausgedehnten Cosinuszuges erzielbar. In der Praxis ist die Zeitdauer der Meßwerterfassung begrenzt. Mathematisch läßt sich die Begrenzung des Interferogramms als Multiplikation mit einer Rechteck-Funktion darstellen:

$$I'(x) = I(x) \text{rect}(x) \quad \text{mit} \quad \text{rect}(x) = \begin{cases} 1 & |x| \leq a \\ 0 & |x| > a \end{cases}$$

Die Fouriertransformation der Rechteck-Funktion liefert eine $\frac{\sin(x)}{x}$ - Funktion.

Bei der Fouriertransformation wandelt sich ein Multiplikationsvorgang in einen Faltungsvorgang, der durch folgende Gleichung beschrieben ist:

$$h(x) = f(x) * g(x) = \int_{-\infty}^{\infty} f(u) g(x-u) du$$

Die Fouriertransformation des begrenzten Interferogramms liefert also eine Faltung der Spektrallinien mit $\frac{\sin(x)}{x}$ - Funktionen. Die Linie im Spektrum wird über einen größeren Bereich "verschmiert". Die Breite dieser Spektralfläche hängt von der Interferogrammlänge ab. Um Informationsverluste zu vermeiden, wurde die Transformationsgröße so gewählt, daß die Halbwertsbreiten der Spektralelemente kleiner sind als die Auflösungsbreiten nach Rayleigh. Dies läßt sich gegebenenfalls durch rein rechnerische Vergrößerung der Interferogramme mit dem Mittelwert derselben erreichen. Die Störungen des Spektrums durch die seitlichen Ausläufer der $\frac{\sin(x)}{x}$ - Funktion lassen sich durch die Wahl eines anderen

Auswahlfensters statt der Rechteck-Funktion vermeiden. Der gebräuchlichste Typ ist das Hanning-Fenster:

$$S(x) = \begin{cases} \frac{1}{1.84} (1 + 0.84 \cos(\pi \frac{x}{a})) & \text{für } |x| \leq a \\ 0 & \text{sonst} \end{cases}$$

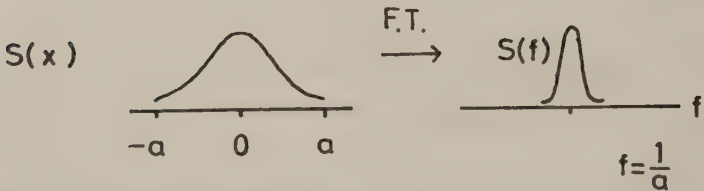
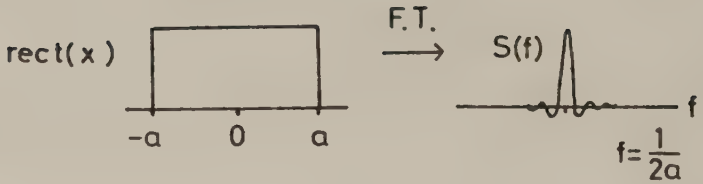
Die Abtastung des Interferogramms wurde als Multiplikation mit der Abtastfunktion beschrieben. Die Fouriertransformierte der Abtastfunktion ist wieder eine Abtastfunktion:

$$F.T. \omega(x) = \omega(\sigma)$$

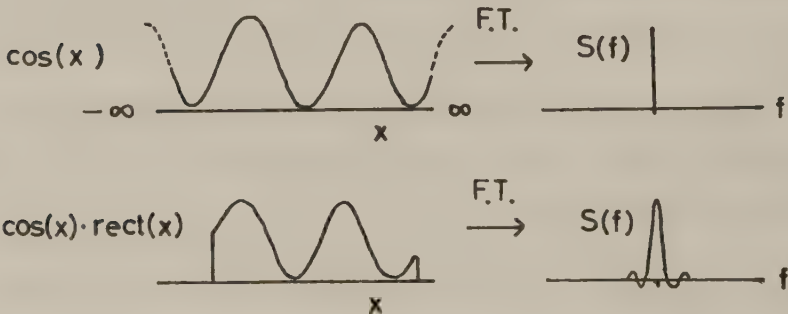
Die Fouriertransformierte des Interferogramms ist das Spektrum. Die Multiplikation des Interferogramms mit der Abtastfunktion führt zur Faltung des Spektrums mit der Abtastfunktion im Frequenzbereich und somit zur Replikation des Spektrums.

Anhand verschiedener grafischer Darstellungen sollen noch einmal wesentliche Züge dieses Abschnittes hervorgehoben werden.

Zum Auswahlfenster (Abb.1.3.2/1.3.3). Die Begrenzung des Interferogramms führt zur Verbreiterung der Linien im Spektrum. Die seitlichen Ausläufer des Spektrums des Rechteck-Fensters lassen sich durch die Wahl des Hanning-Fensters vermeiden. Dabei sinkt die Auflösung aber um den Faktor 2. Bei anderen Spektralapparaten wie Prismen- oder Gitterspektrometern kennt man die Apparatfunktion des Geräts. Sie kennzeichnet die Veränderung der idealisierten Spektrallinie durch das Gerät bei einfallendem monochromatischem Licht. Diese Verbreiterung ist beugungsbedingt, hängt vom Gerät ab und begrenzt die Auflösung. In der Fourierspektroskopie entsprechen die Spektren der Auswahlfenster diesen Funktionen. Sie sind aber im Gegensatz zu den Apparatfunktionen frei wählbar.

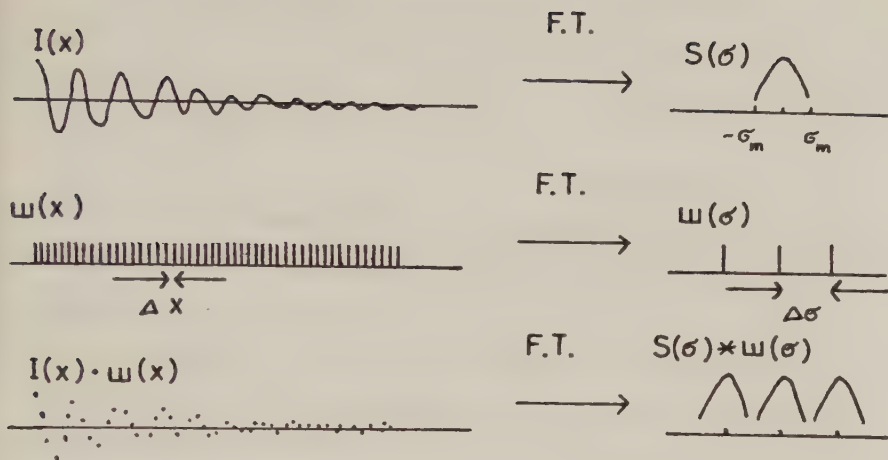


1.3.2 Auswahlfenster



1.3.3 Unendliches und endliches Interferogramm (Cosinus)

Zur Digitalisierung (Abb. 1.3.4): Die Abtastfrequenz wird durch das Shannon-Theorem festgelegt. Die Faltung mit der Abtastfunktion im Frequenzbereich führt zur Replikation der Spektren. Zur Vermeidung der Spektralüberlappung muß $\Delta\sigma \geq 2\sigma_{\max}$ gewählt werden (Shannon-Theorem!).



1.3.4 Digitalisierung

Zuletzt soll die numerische Fouriertransformation erörtert werden. Die numerische Approximation des Fourierintegrals lautet:

$$S_C(f) = \sum_k X(k) \cos(2\pi k f / N); \quad \begin{matrix} f = 0, 1, 2 \dots N/2 \\ k = 0, 1, 2 \dots N-1 \end{matrix}$$

$$S_S(f) = \sum_k X(k) \sin(2\pi k f / N)$$

Die Amplitude errechnet sich, wie folgt:

$$A(f) = \sqrt{S_C(f)^2 + S_S(f)^2}$$

Cooley und Tukey entwickelten einen schnellen Algorithmus zur Berechnung der obigen sogenannten diskreten Fouriertransformation, die Fast Fourier Transformation (Cooley/Tukey 1965).

Diese Entwicklung zusammen mit der Entwicklung billiger und schneller Digitalrechner ist eine der Hauptursachen für die rasche Entwicklung der Fourierspektroskopie in den letzten Jahren.

Interferogrammform:

Die Form der Interferogramme wird im wesentlichen durch die Zahl der beteiligten Spektralkomponenten bestimmt. Je mehr spektrale Elemente sich in der Lichtquelle befinden, desto rascher enden die Modulationen des Interferogramms. In der Weißlichtposition sind alle Cosinus-Schwingungen in Phase. Hier ist das Maximum des Interferogramms, und dessen Lichtzusammensetzung gleicht der des einfallenden Lichtes. Entfernt man sich von dieser Position, so erlöschen zuerst die Komponenten mit den kürzeren Wellenlängen. Entfernt man sich noch weiter, beginnen die langwelligeren Komponenten zu erlöschen, während die kurzwelligsten Elemente schon wieder konstruktiv interferieren. Je weiter man sich von der Weißlichtposition entfernt, um so komplexer ist die jeweilige spektrale Zusammensetzung des Ausgangslichtes. Diese Überlagerung vieler verschiedener Komponenten führt dazu, daß in Positionen, wo die Einzelschwingungen nicht mehr alle ähnliche Phasen haben, die Gesamtmodulation immer geringer wird.

Bei Lichtquellen mit wenigen Spektralelementen wiederholen sich die Orte starker Gesamtmodulation. Es handelt sich hier um Schwebungen. Das kleinste gemeinsame Vielfache der Zahl der Einzelelemente bestimmt den Wiederholungsort.

Bei breiten Spektren liegt er quasi im Unendlichen.

Aus diesen Unterschieden in der Interferogrammform folgt, daß bei Linienspektren das Signal-Rausch-Verhältnis während des ganzen Weges relativ konstant ist, während bei breiten Spektren dieses Verhältnis in Positionen, die von der Weißlichtposition weiter entfernt liegen, schlecht wird. Die wesentlich Spektralinformation gewinnt man hier aus Interferogrammabschnitten, die um die Weißlichtposition herum gewonnen werden.

Interferogramme, die zur Weißlichtposition achsensymmetrisch sind, gewinnt man, indem man sich mit dem Spiegel der Weißlichtposition nähert, sie erreicht und dann darüber hinaus fährt. Die Interferogrammabschnitte von der Start- bis zur Weißlichtposition und von dieser bis zur äquidistanten Endposition sind dann achsensymmetrisch.

Modifikationen der Interferogrammform entstehen durch frequenzabhängige Phasenverschiebungen der Einzelelemente (Chirping) und durch nichtlineare Verzerrungen z.B. bei den Antwortinterferogrammen, wenn die biologischen Versuchsubjekte auf sinusförmige Reizung nicht exakt sinusförmig reagieren.

Die Fourierspektroskopie hat gegenüber den herkömmlichen Verfahrensweisen zwei große Vorteile, nämlich den Lichtstärke- und den Multiplex-Vorteil. Diese sind auch der Grund dafür, daß FIS eine so leistungsfähige Methode ist.

c) Lichtstärke- oder Jacquinot^x-Vorteil

Bei der Ableitung des Interferogramms wurde von einer Punktlichtquelle auf der Achse a ausgegangen. Durch die optische Abbildung wird das Licht von dieser Quelle wieder in einem Punkt vereinigt. Das trifft auch für die einzelnen Punkte einer Flächenlichtquelle zu. Dabei entsteht nun am Ausgang, senkrecht zur Austrittsachse, ein Ringsystem, wo sich Zonen der Verstärkung und Auslöschung abwechseln. Das Interferenzmuster kann man sich an der planparallelen Luftschicht zwischen dem Spiegel S_1 und dem virtuellen Bild von S_2 - parallel dazu - entstanden denken. Der Ort des geringsten Gangunterschiedes zwischen den zwei Teilstrahlen bildet den inneren Kreis 0ter Ordnung. Mit zunehmender Wegdifferenz zwischen den zwei Teilstrahlen schrumpft die Größe dieses Kreises und der anderen Ordnungen, und die Intensität an jedem Punkt des Ringsystems wird dabei sinusförmig moduliert. Die Apertur des Interferometers muß auf eine Ordnung beschränkt werden, um eine Modulationsverminderung zu vermeiden. Man wählt die 0te Ordnung. Die Apertur für ein bestimmtes $x_{\max}$ wird genügend klein gewählt, damit nur diese Ordnung austritt. Die Größe der Blende ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$r = f_1 \cdot \tan \sqrt{\frac{\lambda}{x_{\max}}}$$

Der linke Term r stellt den Radius des ersten dunklen Ringes als Funktion der Wegdifferenz der zwei Teilstrahlen dar.

^x P. Jacquinot, franz. Physiker, Entdecker des Lichtstärke-Vorteils der Fourierspektroskopie.

f ist die Brennweite der Eintrittslinse.

Bei unserem Gerät liegt der Radius r in der Größenordnung von 1 cm.

Charakteristisch für einen Spektralapparat ist der sogenannte Lichtleitwert. Dieser muß im Bezug zur erreichten spektralen Auflösung gesehen werden. Der Lichtleitwert ist ein Maß für die Lichtmenge, die durch das System geschickt werden kann. Er hängt u.a. von der Eintrittsöffnung des Gerätes ab.

Im Vergleich seien die "étendues"^x für ein Gitterspektrometer und für ein Fourierinterferometer gezeigt:

Gitterspektrometer:

$$E_G = \frac{lA}{fR}$$

l : Länge des Eintrittspaltes

f : Brennweite der Eintrittslinse

A : Fläche der Linse

R : Auflösungskoeffizient $\frac{\sigma}{\Delta\lambda}$

Fourierinterferometer:

$$E_F = \frac{2\pi A}{R}$$

Da das Verhältnis l/f beim Gitterspektrometer kaum $1/30$ überschreitet, ergibt sich durch ein Fourierinterferometer eine Verbesserung um den Faktor 200! Die Ursache für diese Verbesserung liegt in der kreisförmigen Öffnung des Geräts begründet.

^x étendue: Lichtleitwert/ T mit T : Transmission der Optik

Multiplex- oder Fellgett^x-Vorteil:

Der größte Vorteil der Fourierspektroskopie ist der Multiplex-Vorteil. Wie oben gezeigt, ist der Lichtleitwert eine für einen Spektralapparat charakteristische Größe. Bei den Spektralapparaten unterscheidet man zwischen zwei Instrumententypen, den Spektrographen und den Spektrometern. Bei ersteren erhält man alle spektralen Elemente gleichzeitig mit einer Messung auf einer Fotoplatte, bei der zweiten Art werden die einzelnen spektralen Elemente sequentiell gemessen. Man kann hierbei einen wesentlich empfindlicheren Meßapparat als eine Fotoplatte verwenden. Das Signal-Rausch-Verhältnis hängt von der Meßzeit ab. Zur Verkürzung der Meßzeit oder zur Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisse sind zwei Vorgehensweisen tauglich:

1. Erhöhung des Lichtleitwertes
2. Anordnung zur gleichzeitigen Messung aller spektralen Elemente mit einem empfindlichen Fotodetektor.

Zum ersten Punkt gibt der vorige Abschnitt Auskunft. Zum zweiten Punkt ist folgendes zu sagen. Es bestünde die (theoretische) Möglichkeit, viele empfindliche Fotodetektoren parallel anzuordnen. Dies scheitert aus finanziellen und geometrischen Gründen. Man kann aber die spektrale Information geeignet kodieren, um sie aus dem auf einen Fotodetektor geschickten Gesamtsignal wieder herauszulösen. Dies geschieht mit Hilfe des Inter-

^xp. Fellgett, engl. Physiker. Leitete die Entwicklung der Fourierspektroskopie ein.

ferometers, das Wellenlänge in Frequenz kodiert. In der Nachrichtentechnik nennt man ähnliche Verfahren, bei denen über einen Kanal viele Informationen gleichzeitig geleitet werden, Multiplex-Verfahren.

In Kapitel 1.1. wurde erwähnt, daß der Multiplex-Vorteil eine Funktion der Zahl der spektralen Elemente ist. Genauer: Er ist gleich der Wurzel der Zahl der beteiligten Elemente. (Zur Ableitung siehe Sakai 1970).

Je mehr Elemente sich in einem Spektrum befinden, desto besser ist die Methode der Fourierspektroskopie gegenüber anderen Verfahren.

Das Problem des Rauschens in der Fourierspektroskopie und sein Zusammenhang mit dem Multiplex-Vorteil stellt sich, wie folgt, dar. In der FSP gibt es im wesentlichen vier Rauschquellen: Detektorrauschen, Photonenrauschen, Intensitätsschwankungen und durch die Digitalisierung bedingtes Rauschen.

Das Detektorrauschen oder bei FIS das Rauschen des biologischen Objekts ist jenes Rauschen im gemessenen Spektrum, das durch den Multiplex-Vorteil vermindert wird. Bei einem Fotomultiplier ist es von der Intensität der Quelle unabhängig. Bei biologischen Objekten ist die Situation etwas anders (Smola/Gemperlein 1973). Hier nimmt z.B. bei *Calliphora* das Rauschen mit steigender Intensität ab. Bei sinkender Intensität steigt die Empfindlichkeit, aber auch das Rauschen. Bei den FIS-Messungen zeigte sich, daß bei geringerer Intensität die Antwort-

spektren zu rauschstark für eine sinnvolle Auswertung sind. Eine genaue quantitative Analyse des FIS-Rauschens muß aber noch gemacht werden, ebenso ist der erzielbare Multiplex-Vorteil noch genauer festzustellen.

Das Photonenrauschen, das Rauschen der Quelle, steigt mit der Quadratwurzel der gemessenen Photonenzahl. Ein Fourierinterferometer läßt N mal mehr Licht durch als ein herkömmliches Spektrometer (N : Zahl der gemessenen Spektralelemente). Somit steigt das Rauschen mit der Quadratwurzel aus N . Dies hebt gerade den Multiplex-Vorteil auf. Der Multiplex-Vorteil ist also nur dann gewährleistet, wenn das Detektorrauschen wesentlich größer ist als das Photonenrauschen.

Das Rauschen durch langsame Modulationen der Quelle und das digitalisierungsbedingte Rauschen lassen sich mit geeigneten technischen Hilfsmitteln stark reduzieren. Letzteres entsteht bei zu ungenauer Abtastung sowie bei der Verwendung zu gering auflösender Analog-Digital-Wandler.

Zum Abschluß sei noch auf die Fehlerquellen in der Fourier-spektroskopie hingewiesen. Im wesentlichen lassen sich hier sechs Gruppen unterscheiden:

Zum ersten bestehen Probleme bei reizunabhängigen Schwankungen des Interferogramms. Langsame Veränderungen (Empfindlichkeitsveränderungen etc.) führen zu weniger stark störenden langsamen Komponenten im Frequenzspektrum. Impulsartige Störungen führen zu wellenartigen Störungen des ganzen Spektrums.

Als zweites Problem sind Dejustierungen des Interfero-

eterspiegels zu nennen. Eine konstante Dejustierung führt nur zu einer Minderung des Kontrasts. Variable Dejustierungen dagegen modifizieren das Auswahlfenster und verändern Höhe und Form des Spektrums.

Phasenprobleme entstehen bei Fehlern der Kompensationsplatte für den Strahlenteiler, bei Systemen mit Frequenz- und Phasengang sowie bei falscher Zuordnung der Abtastfunktion zum Interferogramm derart, daß der Abtastbeginn nicht bei der Weißlichtposition ist.

Diese Schwierigkeiten treten aber nur bei reinen Sinus- oder Cosinus-Fouriertransformationen auf. Da unsere Untersuchungsobjekte Phasengänge besitzen, ist es grundsätzlich unmöglich, diese Transformationsarten, die aus Zeit- und Platzgründen (Speicherplatz im Rechner) angewendet werden, einzusetzen. Wir verwenden deshalb eine komplexe Sinus-Cosinus-Transformation.

Die verschiedenen Phasenlagen der einzelnen Frequenzen im Antwort-Interferogramm führen zu unsymmetrischen Interferogrammen. Unsymmetrische Interferogramme entstehen auch durch Aberrationen im optischen System.

Als vierte Fehlermöglichkeit sind periodische Abtastfehler zu nennen. Sie führen zu zusätzlichen "Geisterlinien" im Spektrum.

Langsam driftende Abtastfehler führen zu einer "Verschmierung" der einzelnen Spektrallinien.

Als sechster und letzter Punkt seien wechselnde Unsicherheiten bei der Abtastung genannt. Falls gewisse Abtastpunkte richtig liegen und andere nicht, führt dies zu einer nicht-

linearen Verzerrung der Cosinusmodulationen. Die nichtlinearen Anteile liegen aber in anderen Frequenzbereichen als die spektralen Komponenten.

1.4 Versuchsaufbau - Elektronik

In der Erläuterung des Versuchsaufbaus sind Details über die Einzelkomponenten nicht enthalten. Eine tabellarische Zusammenfassung am Ende des Kapitels gibt Auskunft über Herkunft, Typennummer und Spezifikation der einzelnen Bestandteile des Aufbaus.

Im Mittelpunkt des Versuchsaufbaus steht ein Michelson-Interferometer für den nahen infraroten, den sichtbaren und den ultravioletten Spektralbereich.

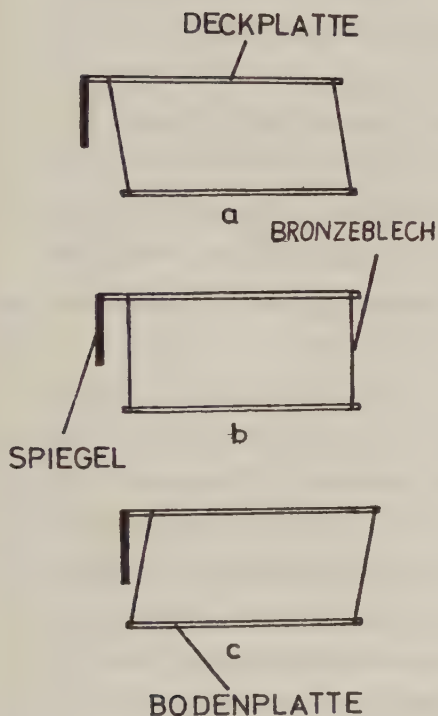
Nach Plänen von Herrn Lindauer und Herrn Parsche wurde das Interferometer von Herrn Weber von der feinmechanischen Werkstatt des Hauses mit äußerster Präzision gebaut.

Die Grundstruktur des Michelson-Interferometers (Abb.1.4.1) ist ein massiver Aluminium-Quader aus verschraubbaren Aluminiumplatten. Zwei kreisförmige Öffnungen enthalten die Ein- und Austrittsoptiken.

Dicht daneben wurden zwei kleine Kanäle gebohrt. Durch den einen tritt der umgelenkte Laserstrahl in das Interferometer ein. Der andere Kanal enthält eine Fotozelle zur Registrierung des Laserlichtes. Vor dieser Bohrung liegt ein Interferenzfilter mit $\lambda_{\max} = 628 \text{ nm}$. Das Filter vermindert den Einfluß der Lichtquelle auf die cosinusförmige Modulation des Laserlichtes.

Im Inneren des normalerweise geschlossenen Interferometers befinden sich zwei Planspiegel und ein Strahlenteiler aus CaF_2 . Ein Spiegel ist beweglich aufgehängt, so daß er durch

Die Funktionsweise der Führung ist aus folgender Abbildung zu ersehen.



Die Parallelogrammführung besteht aus einer Boden- und einer Deckplatte aus Aluminium. Die Deckplatte ist bis auf einen Rand offen. Vorne und hinten befinden sich zwei Bronzebleche, die an den Aluminiumstücken befestigt sind.

Der Spiegel ist vorne an der Deckplatte befestigt.

Im Ruhezustand (b) werden die beiden Platten mit Hilfe einer Mikrometeruhr exakt parallel justiert.

Bei Verkipfung der Führung nach vorne (a) oder nach hinten (c) wird diese Parallelität bei nicht zu großer Auslenkung (wenige mm) beibehalten oder, anders ausgedrückt, der vorne befestigte Spiegel kann ohne Verkipfung vor oder zurück bewegt werden.

1.4.2 Parallelogrammführung

Der Spiegel wird momentan durch eine ansteuerbare Piezokeramik bewegt. Diese sitzt in der mittleren Öffnung der Deckplatte und drückt auf den hinteren Teil der oberen

Platte. Die Halterung für die Keramik ist auf der Bodenplatte verschraubt.

Die Reizlichtquelle ist eine Xenon-Hochdrucklampe. Die Stromversorgung erfolgt aus einem Gleichspannungsnetzteil.

Als Referenz zur Frequenz-Wellenlängen-Umrechnung und zur Kontrolle der kontinuierlichen Bewegung dient ein Helium-Neon-Laser. Das Laserlicht wird von einer Fotozelle aufgefangen.

Das Reizlicht passiert einen Graufilterwechsler, der entweder halbautomatisch durch Schalter oder vom Rechner her gesteuert werden kann. Die Mechanik des Wechslers wurde von Herrn Hein von der feinmechanischen Werkstatt des Hauses, die Elektronik von Herrn Steiner entwickelt.

Es stellte sich heraus, daß das Interferometer temperaturstabilisiert werden muß, da ohne Temperaturregelung nach gewisser Zeit das Spiegelsystem verkippt. Die Regelung arbeitet so, daß ein Thermoelement im Inneren des Interferometers die nötigen Meßwerte an eine Schaltung liefert, die in Abhängigkeit von diesen ein unter dem Interferometer liegendes Heizkissen mit verschiedener Häufigkeit an- und ausschaltet.

Die für die Piezokeramik nötige Hochspannung liefert ein Hochspannungsnetzteil, das sich von außen ansteuern läßt.

Die Ansteuerung des Hochspannungsnetzteils kann momentan auf drei verschiedene Arten erfolgen:

1. DAC-Ansteuerung vom Rechner aus
2. Regelungsschaltung
3. Rampe aus einem Funktionsgenerator.

Zu 1:

Der Rechner gibt über einen 16-Bit-DAC eine Rampe auf das Netzteil, und parallel dazu werden Meßwerte erfaßt.

Es werden dabei Laser-, Fotomultiplier- und Antwortsignale parallel erfaßt. Die Errechnung der Abtastpunkte erfolgt nachträglich. Bei einer Genauigkeit von $\lambda/90$ sind mit dieser Methode ca. 32λ Weg zu erfassen.

Die Vorteile der Methode liegen darin, daß mit verschiedener Frequenz gereizt werden kann und daß der Abtastquotient frei wählbar ist ($\lambda/4, \lambda/8, \lambda/16, \lambda/32$). Dank einer Vorlaufphase des Bewegungssystems ist dieses Verfahren sehr linear.

Zu 2:

Vom Verfasser und Herrn Steiner konzipiert und von Herrn Steiner entwickelt, dient die Regelung zum Mitteln von Interferogrammen im Zeitbereich.

Das Prinzip ist folgendes: Das cosinusförmig modulierte Lasersignal wird mit einer elektronischen Cosinusvorgabe verglichen (Fensterdiskriminator). Abweichungen führen zu einer entsprechenden Anpassung der das Hochspannungsnetzteil steuernden Grundrampe. Die Perioden werden mitgezählt und Abtastimpulse werden abgeleitet. Da immer eine eindeutige Zuordnung von Zählerstand und Spiegelposition gegeben ist, läßt sich ein Startsignal ableiten, das ein Mitteln der Einzelinterferogramme ermöglicht. Der maximal fahrbare Weg liegt momentan bei 72λ .

Bei größeren Wegen und bei Verwendung von Hin- und Rücklauf

ist die maximale Mittelungsrate gleich sechzehn, bei Verwendung nur eines Laufes unbegrenzt. Die Modulationsfrequenz des Laserlichts liegt gegenwärtig bei 4,6 Hz. Gewisse Probleme mit der exakten Nachfolgung der Vorgabe (Entstehen von Nicht-linearitäten im Spektrum) werden zur Zeit behoben.

Zu 3:

Von einem Funktionsgenerator wird eine in gewissen Grenzen beliebig schnelle Rampe auf das Hochspannungsnetzteil gegeben.

Mit einem von Herrn Steiner konzipierten und von Herrn Lindauer entwickelten Impulsgeber werden Triggerimpulse für den Rechner erzeugt.

Der maximale Weg beträgt zur Zeit 128λ . Im Prinzip sind mit dieser Aussteuerung Meßzeiten im Millisekunden-Bereich erzielbar.

Neben diesen auf der Piezokeramik basierenden Verfahren laufen Versuche mit anderen Antrieben (Exzenter-Antrieb), um die Auflösung zu erhöhen.

Der Weg des Reizlichtes der Xenon-Lampe ist aus Abbildung 1.4.3 ersichtlich.

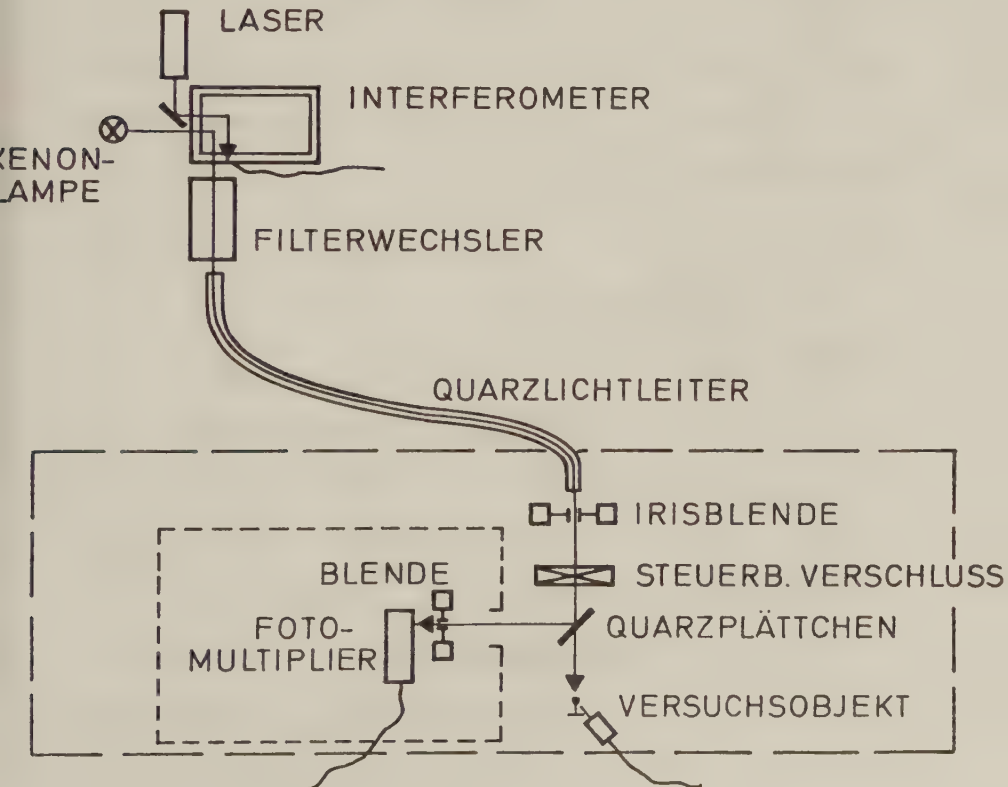
Nach der Kodierung der einzelnen Wellenlängen im Interferometer (spezifische Frequenz) gelangt das Licht - nach eventueller Abschwächung durch Quarzgraufilter - zu einem Quarzlichtleiter und wird in ihm in einen mit schwarzen Tüchern bedeckten, aus Drahtnetzteilen bestehenden Faradaykäfig geleitet, in dem sich die Ableitapparatur befindet.

Eine Irisblende dient zur Lichtabschwächung bzw. zur Fokussierung bei Verwendung eines Objektivs (nicht abgebildet).

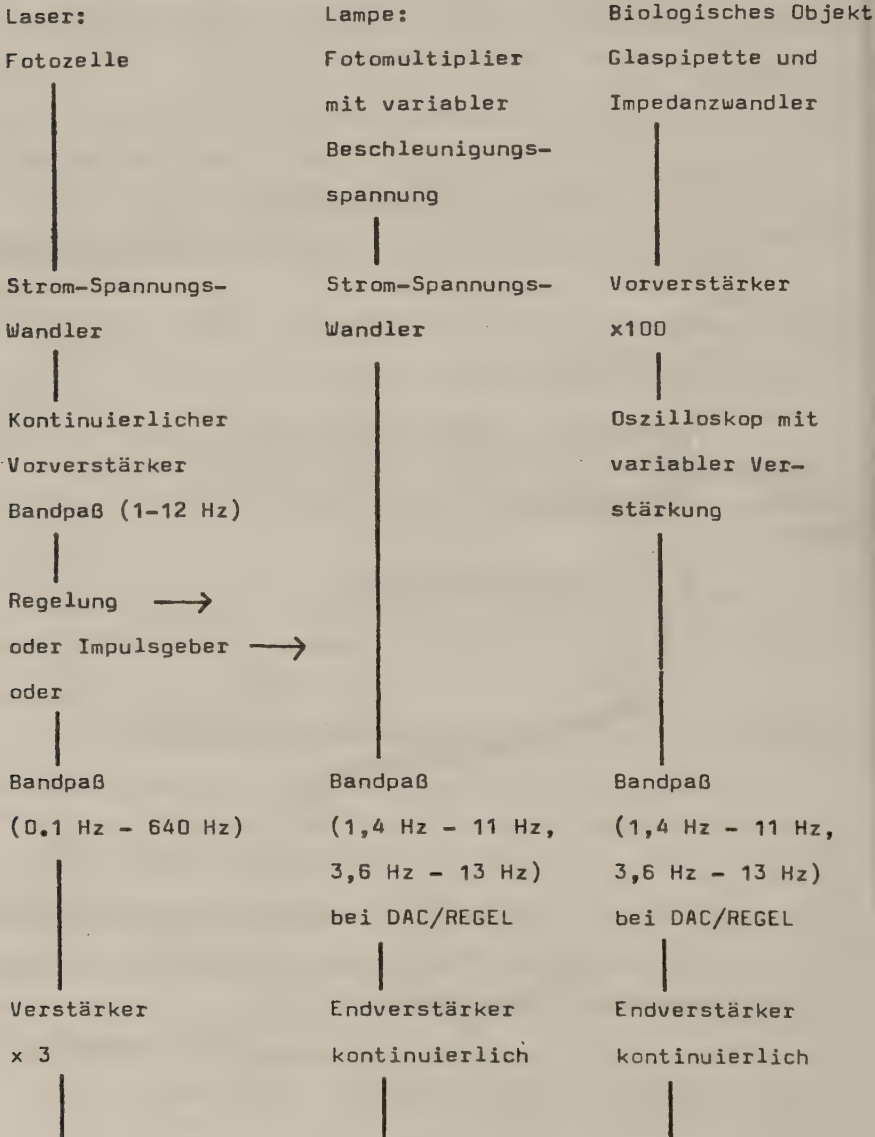
Ein steuerbarer Verschluss generiert Rechteckreize zur Identifikation der Antwort und zur optimalen Ausrichtung des Versuchsobjekts.

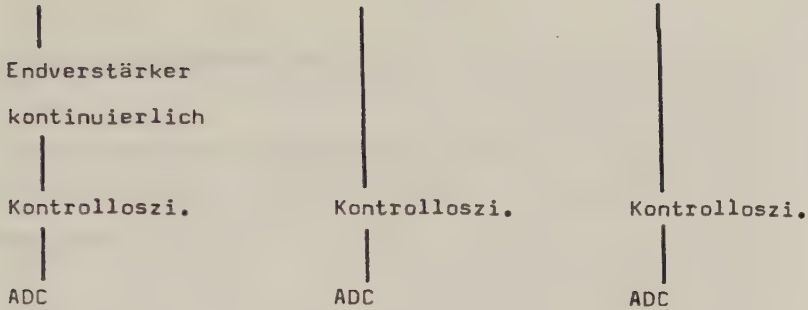
Ein Quarzplättchen trennt den Strahl auf. Ein Teil dient zur simultanen Reizmessung mit einem Fotomultiplier. Der andere stellt den Reiz für das Versuchsobjekt dar.

Der Fotomultiplier ist noch einmal gegen Streulicht abgeschirmt.



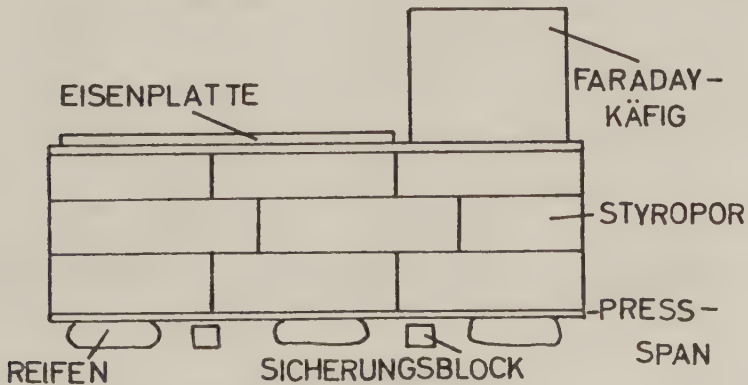
Die Erfassung und Weiterbehandlung der Signale ist folgendem Schema zu entnehmen.





Als letztes sei erwähnt, daß das Interferometer und Zubehör sowie der Faradaykäfig mit der Ableitapparatur auf einem schwingungsdämpfenden Aufbau stehen, da vor allem das Interferometer sehr erschütterungsempfindlich ist. Der Aufbau besteht aus sechs Motorrollerreifen, die eine Preßspanplatte tragen. Nach einer Schicht von Styroporplatten folgt wieder Preßspan und dann eine Eisenplatte.

Erfahrungen von Arbeitsgruppen in der Laserphysik am Physik-Department der TU München in Garching führten uns zu dieser Art des Aufbaus.



1.4.4 Schwingungsdämpfender Aufbau

Zusammenfassung und Spezifikation der Einzelkomponenten des Versuchsaufbaus:

Ein- und Austrittsoptiken: Dreilinsige UV-Achromaten,
 $d=30\text{ mm}$, $f=120\text{ mm}$

Strahlenteiler: aus CaF_2 , Planität $\lambda/10$, metallischer Graufilterbelag

Planspiegel: Alu-bedampft mit Vioflex-Schutzschicht, $\lambda/20$ eben, $d=50\text{ mm}$

Laser: Helium-Neon-Laser mit $\lambda_{\text{max}}=632,8\text{ nm}$, 1 mWatt

Fotozellen: im Interferometer OSD 1-5 PV, sonst Typ "UV enhanced" (Centronic bzw. RCA)

Mikrometerschrauben: Differential MIC-Head (Burleigh)

Piezokeramik: 40 μ Ausdehnung bei 1000 Volt (Physik Instrumente)

Lampen: Xenon-Hochdrucklampe XBO 150 W/1 versorgt von einem Gleichspannungsnetzteil

Hg/13 mit Wechselspannungsversorgung

Fotomultiplier: RCA-1P28/V1

Filter: Graufilter aus Quarzglas (Balsers)

Interferenzfilter im Interferometer: $\lambda_{\text{max}}=628\text{ nm}$ (schmalbandig)

Farbfilter: BG 24 (1 mm, 2 mm, 4 mm), UG 5 (1 mm,

3 mm), UG 11 (1 mm, 3 mm), UG 3 (1 mm), BG 20₁ (Schott)

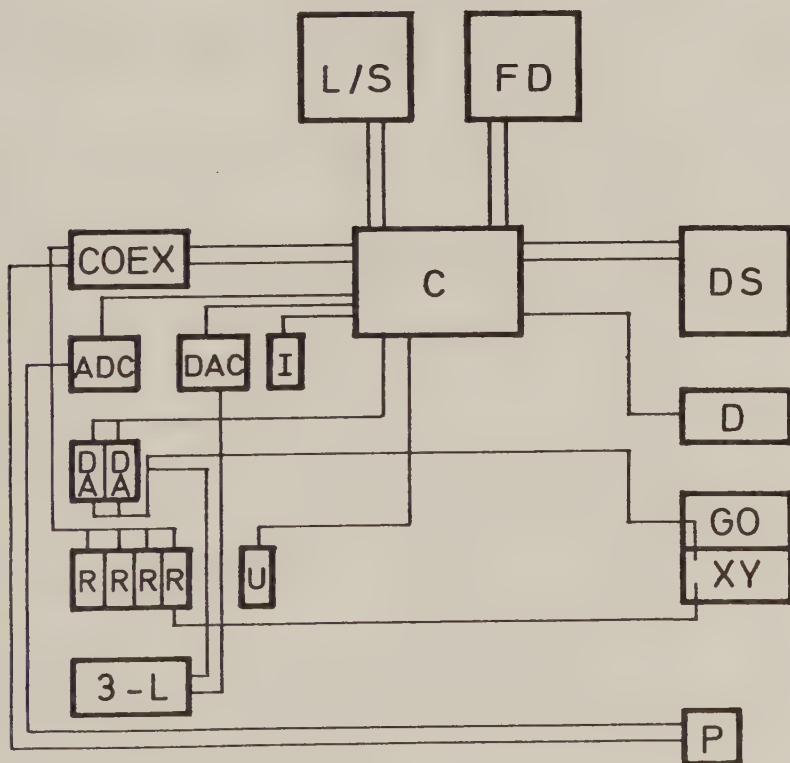
Lichtleiter: UV-Lichtleiter, $l=1\text{ m}$ (Schott)

Elektr.Filter: Aktivfilter AF 173, Butterworth ohne Anhebung

1.5 Rechnersystem und Programme

Genaue Spezifikationen der Hardware und Software, soweit sie nicht selber hergestellt wurde, finden sich am Ende des Kapitels.

Zur Erläuterung des Rechnersystems dient die folgende Skizze:



1.5.1 Rechner und Peripherie

C: Computer.

Besteht aus zentraler Recheneinheit, Kernspeicher, Floppy-Disc-Controller, Frontplatte, Gehäuse und einem Zusatzgehäuse. Dieses enthält drei sogenannte I/O-Platinen zum Anschluß peripherer Geräte sowie zwei Utility-Platinen zur Ansteuerung der Lese-Stanz-Einheit.

L/S: Einheit zum Lesen und Stanzen von Lochstreifen.

FD: Floppy-Disc-Doppellaufwerk als Massenspeicher.

PS: Sichtgerät mit Tastatur zum Programmieren und Steuern der Rechneranlage.

D: Drucker für Graphik, Ausdruck von Listings und sonstigen Texten.

GO: Großbildoszilloskop für Graphikzwecke.

XY: XY-Schreiber mit steuerbarem Schreibkopf zur Auszeichnung des auf dem Großbildoszilloskop sichtbaren Bildes.

DA: 2 8-Bit-DACs für Graphik (GO/XY).

DAC: 16-Bit-DAC u.a. für Steuerzwecke (Hochspannungsnetzteil

R: Reed-Relais-Module für Schaltzwecke (Schreibkopf des XY-Schreibers, Verschuß etc.).

I: Eingänge für Interrupts (Abtastimpulse).

ADC: Achtkanal-12 Bit-ADC.

U: Vom Rechner abfragbare Digitaluhr.

COEX: In- und Output, Impulsausgabe und Pegelprüfung vom Rechner.

3-L: 3-Linien-Schreiber zur Ausgabe der Interferogramme von Laser, Lampe und Antwort.

P: Abfragbare Linearpotentiometer für Digitalisierung und Graphik.

Zur Nutzung der oben dargestellten Rechneranlage wurde vom Verfasser ein Programmsystem konzipiert und entwickelt (Paul 1981). Dabei wurden Programme von Herrn Fritz und Herrn Dr. Gemperlein mitbenutzt.

Das Programmsystem enthält drei Komponenten:

1. Ein BASIC-Interpreter der Herstellerfirma
2. Selbstgeschriebene Maschinenspracheprogramme
3. Selbstgeschriebene BASIC-Programme

Zu 1:

Der Basic-Interpreter besitzt die üblichen Befehle und Funktionen. Die Rechengenauigkeit beträgt 6 Stellen.

Er bietet Matrix-Operationen und gibt vor allem dem Ersteller von eigenen Maschinenroutinen viele Hilfen (Verwendung interpretereigener Routinen).

Zu 2:

Zur Erledigung zeitkritischer und zeitaufwendiger Aufgaben wurde eine Reihe von Maschinenroutinen mit Hilfe eines Assemblers erstellt.

Diese lassen sich in zwei Gruppen unterteilen:

- a) Austauschbarer Maschinenprogrammteil "Kopf" (Fritz 1977).
- b) Residente, mit dem Interpreter verbundene Maschinenroutinen.

Zu a)

Dieser Block wird aus Platzgründen bei Bedarf gegen einen Teil

des geladenen Programms ausgetauscht (über Floppy-Disc) und dient hier zur Durchführung der Fouriertransformation.

Zu b)

Diese Routinen dienen vielfältigen Zwecken, so dem Laden und Speichern von Werten aus und in den Kernspeicher, dem Umkopieren von Zeilen und Spalten in Matrizen, dem Bestimmen von Extremwerten und dem Sortieren von Datenzeilen, dem Lesen und Speichern von Daten von und auf Lochstreifen, der Charaktereingabe per Interrupt, der Ansteuerung des COEX (Input, Output, Impulsausgabe, Pegelprüfung), der Grafik auf Großbildoszilloskop, XY-Schreiber und DTC, der Erfassung und Abspeicherung von Werten vom ADC, der Aussteuerungskontrolle, dem Lesen und Schreiben von Daten von und auf den Floppy-Disc-Speicher, der schnellen Arithmetik und dem Vergleich von Datenblöcken, dem Lesen und Schreiben von Programmen von und auf den Floppy-Disc-Speicher, der Umnumerierung von Basic-Programmen und dem Wechseln zwischen verschiedenen Formaten. Eine Übersicht der Routinen und ihre Aufrufform findet sich unten.

ML1

AUFRUF: CALL(1,A\$,B\$,C\$,E)

ML1 HOLT DEN INHALT EINER SPEICHERSTELLE ODER
SPEICHERT DORT HINEIN ODER SPRINGT DORTHIN MIT
ODER OHNE BREAKPOINT

A\$: HEX.-ANFANGSADRESSE
B\$: HEX.-ENDADRESSE (=0000 FUER SPEICHERN,HOLEN U.JMP)
C\$: INHALT ODER TEXT
E: 0 = HOLEN
1 = SPEICHERN
-1 = SPRUNG

DIE AKTUELLE STRINGLAENGE MUSS 4 SEIN
B\$<>0000 BREAKPOINT.ERFOLGT KEINE RUECKKEHR NACH
B A S I C, DANN AUF EP =..... STARTEN

BREAKPOINT VERWENDET SCRATCHPAD :1D !!!

ML2

DER AUFRUF LAUTET: CALL(2,A(O,O,O),A(A,B,C),A(X,Y,Z),
B(O,O,O),B(D,E,F),B(U,V,W),T)

ML2 ERMOEGLICHT DEN AUSTAUSCH VON WERTEN IN EIN/ZWEI ODER
DREI-DIMENSIONALEN ARRAYS

A:STARTARRAY B:EMPFANGSARRAY
A,B,C UND D,E,F :NIEDERER ARRAYINDEX
X,Y,Z UND U,V,W :HOEHERER ARRAYINDEX
T : 0(NORMALE REIHENFOLGE DER DATEN)
: 1(UMGEKEHRTE REIHENF. DER ARRAYWERTE)

ZUM BESSEREN VERSTAENDNIS GIBT ES EIN TTY-BILD
D. PROGR. ML2-TEST ENTHAELT ALLE MOEGLICHEN AUFRUFE !

ML3

DER AUFRUF LAUTET:CALL(3,X(M),X(N),Y(M),Y(N),
M1,M2,M3,M4,M5)

ML3 SORTIERT DAS ARRAY Y DER GROESSE NACH UND ZWAR
SO,DASS Y(M) DER GROESSTE UND Y(N) DER KLEINSTE WERT
WIRD

DIE WERTE DES ARRAYS X WERDEN GEGEBENENFALLS MIT DEN
Y-WERTEN MITUMGETAUSCHT

DAS X-ARRAY MUSS DER GROESSE VON Y ENTSPRECHEN
ML3 BESTIMMT AUCH MAXIMA UND MINIMA VON X UND Y
ES FINDEN SICH DANN IN :M1 MAX-X / M2 MIN-X
M3 MAX-Y / M4 MIN-Y

M5:-1(NUR MAXMIN) /0 (NUR SORTIERUNG)/ 1 (BEIDES)
SOLL NUR VON X ODER Y D.MIN U.MAX GESUCHT WERDEN,SO IST
ENTWEDER IM AUFRUF Y(M),Y(M) ODER X(M),X(M) ZU SCHREIBEN

ML4

AUFRUF CALL(4,A(M),A(N),INCR,ENTSCH1,ENTSCH2)

DABEI BEDEUTET:

A(M) DER NIEDRIGERE ARRAYINDEX (ODER =A(N))
A(N) DER HOEHERE ARRAYINDEX

INCR = INCREMENT IN DEM DIE WERTE VON A(N) BIS
A(M) AUSGEHEN WERDEN SOLLEN

ENTSCH1 =-1 AUSTA:

STANZT DEN BEREICH AUF DER
TALLY - STANZE (5-KANAL) IN
4 LOCHREIHEN AUS:
BIT 15
BIT 14/13/12/11/10
BIT 9/ 8/ 7/ 6/ 5
BIT 4/ 3/ 2/ 1/ 0

= 0 EINTA:

LIEST EINEN AUF DER TALLY -
AUSGEGEBENEN BLOCK IN DEN
ANGEGEBENEN BEREICH
MAXIMAL BIS ZUR ANGEGEB.BLOCKLAENGE

= 1 VERIFY:

VERGLEICHT DEN MIT AUSTA AUS-
GEGEBENEN BLOCK DEM ARRAY AUF
LESEFEHLER - HAEHLT BEI FEHLER
MIT AAAA IM CONSOL - REGISTER

= JEDE ANDERE ZAHL:

BEDEUTET UEBERLESEN DES NAECHSTEN
BLOCKES AUF DEM LOCHSTREIFEN

ENTSCH2: 0 FUER STRINGS

1 FUER ZAHLEN

ML5

DER AUFRUF LAUTET CALL(5,A\$,N)

A\$ IST EIN IN BASIC DEFINIERTER UND ZUGEWIESENER STRING
IN DEN IM HINTERGRUND PER INTERRUPT CHARAKTERE ABGELEGT
WERDEN,DIEIRGENDWANN NACH DEM ML5-AUFRUF AUF DER OPERATOR-
KONSOLE EINGEGEBEN WERDEN.

N GIBT DABEI DIE MAXIMALZAHL DER EINZUGEBENDEN CHARAKTERE
AN.

DAS PROGRAMM WIRD DURCH EINGABE VON N CHARAKTEREN BZW.
DURCH IRGEND EIN TTY-EIN/AUSGABEPROGRAMM BEENDET

ML7

DER AUFRUF LAUTET CALL(7,A\$,E)

A\$: STRING DER LAENGE 32 IN DEM DAS BITMUSTER ZUR AUSGABE
AN DEN COEX ABGELEGT IST . ZUM BEISPIEL:

1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 (SPACE ZWISCHEN DEN
ZEICHEN 0 UND 1 NOETIG !)

E: 1 INPUT

E:-1 OUTPUT

ML8

AUFRUF CALL(8,N,M,O)

N = ADRESSE DER CONTROL - LINE AM COEX
BEI JEDEM AUFRUF WIRD HIER EIN IMPULS
VON CA. 200 NSEC DAUER GEGENDET -
VON +5 VOLT AUF 0 VOLT GEHEND

M = ZAHL DER IMPULSE DIE AUSGESENDET WERDEN

O =WARTEZEIT ZWISCHEN DEN IMPULSEN
NACH DER FORMEL :O *4.8MUSEC +12.75MUSEC
-32768 <= O <= 0

ML9

AUFRUF CALL(9,Y,X,O)

FUER DISPLAY EINESWERTEPAARES O<=X,Y<=255

CALL(9,S,Y,X,O)

FUER SCHREIBERAUSGABE S= VORSCHUEBE/PUNKT

CALL(9,W,Y,X,L,P)

ZUR AUSGABE EINES GANZEN DATENBLOCKES

W = ANZAHL DER WIEDERHOLUNGEN

(W=-1 AUSGABE AM X/Y-SCHREIBER)

Y = 1. PUNKT DES Y-KOORDIN. ARRAYS

X = 1. PUNKT DES X-KOORDIN. ARRAYS

L = LAENGE DES ARRAYS, DH. ZAHL DER PUNKTE

P = PARAMETER DER DIE ART DER DARSTELLUNG BESTIMMT

1 = PUNKTE

2 = SENKRECHTE BALKEN

3 = GERADE VERBINDUNG ZWISCHEN DEN PUNKTEN

NEGATIV = AUTOMATISCHE X-ABLENKUNG MIT 'X'

ALS INKREMENT

X UND/ODER Y >=10000 GILT BEI P=3 ALS UNTERBRECHUNG

ML9-DTC: CALL(9,W,Y,X,L,P)

W: NEGATIVE ANGABE DES HAUPTWERTCHARAKTERS (DEZIMAL)

P: ZWISCHENWERTCHARAKTER (ASCII DEZIMAL) + 1/2/3 (SIEHE OBEN)

DIE WERTE MUESSEN >=0 SEIN.DTC IN PICA-MODUS.

CALL(9,Z)

AUSGABE DES CHARAKTERS Z (0<=Z<=127)

ML10

AUFRUF CALL(10,S)

FRAGT SENSE-LINE S (0...7) AM COEX AB

DIE VARIABLE S WIRD -1 WENN +5 VOLT ANLIEGEN

0 WENN 0 VOLT ANLIEGEN

ML11

AUFRUF CALL(11,A\$,B\$,...,F\$,P)

VERURSACHT EINEN SPRUNG IN DAS PROGRAMM

- KOPF -

P = 1 ES WIRD MITGEDRUCKT

= 2 ES WIRD NICHT GEDRUCKT

CALL(11)

DIREKTER SPRUNG IN DAS PROGRAMMSYSTEM -KOPF -

SIEHE SONDERBESCHREIBUNG 'KOPF' !

ML12

```

AUFRUF CALL(12,A,K1,B,K2,...,DAC,AD,ED,S1,S2,Z,R)
  A,B,... = ERSTE WERTE EINES ARRAYS
  (ARRAYS GLEICH NULL SETZEN ,SONST AUFSUMMIERUNG!)
  IN DIE DIE MESSWERTE,DIE AUF
  K1,K2,...= KANAELE DES ADC (0 - 7) ANLIEGEN
  UND VON
  AD BIS AE IN R * 0.1 MSEC
  DIGITALISIERT WERDEN, ABGESPEICHERT
  WERDEN
  S1,S2 =ZEITEN IN R * 0.1MSEC ZU DENEN SELECT-
  IMPULSE AUF CONTROL-LINE 3 DES COEX
  ANLIEGEN
  S1,S2<0 :SELECTBEFEHLE WERDEN UNTERDRUECKT
  CALL(12)
  AUSGABE EINES SELECT-IMPULSES AUF LINE 3

  DAC =256 * INT(MOD(X,16))+Y

  Z VON 0 BIS 15 :SUMMATION VON Z+1 WERTEN
  Z<0 :FEHLER !

```

R=-1:INTERRUPTBETRIEB:

DATENUEBERNAHME GETRIGGERT DURCH INTERRUPT RNT1
(IO-MODUL :16)

INTERRUPTSTELLEN: SCRATCH-PAD :42/:43

ML13

```

AUFRUF CALL(13)
ML13 MACHT BEST. ADC-KANAELE UEBER DEN DAC 'TRANSPARENT'
FOLGENDE PARAMETER WERDEN AM COEX GESETZT:
BIT 15 : AN -> ENDE DES PROGRAMMS
BITS 12,13,14 -> FESTLEGUNG DES ADC-KANALS
BITS 0 BIS 7 GEBEN EINEN VERGLEICHSWERT VOR

```

ML14

```

AUFRUF CALL(14,A(M),A(N),SEKTOR,ZYLINDER,UNIT,READ/
WRITE,ENTSCHEIDUNG)
LADEN UND SPEICHERN VON ARRAYS (E=0),STRINGS (E=1)
ODER KERNSPEICHERBEREICHEN (E=-1)(LADEN NUR BIS
:6B MOEGLICH.DEZIMALE ADRESSE ANGEBEN !)
(ALSO: A(M),A(N) -AS(M,M),AS(N,N) -DEZAD.UNTEN ,OBEN)
S,Z: ALS VARIABLE VORGEBEN ! DIESE ENTHALTEN NACH DEM
AUFRUF DIE ENDADRESSE DES PLATTENBEREICHS
UNIT 0 BIS 9 MOEGLICH.AUF WRITE-PROTECT ACHTEN
SEKTOR 1 BIS 26 ,ZYLINDER 0 BIS 76 MOEGLICH
R/W : 4 -> LESEN ,10 -> SCHREIBEN

```

ML16

```

DER AUFRUF LAUTET CALL(16,A(M),A(N),M,ENTSCH1,0)
ODER CALL(16,A(M),A(N),B(M),B(N),M,E1,1)
ML16 SUMMIERT ARRAYS AUF (VERSION1),DIE SUMME STEHT
IN M ODER ADDIERT/MULTIPL. MIT M DAS ARRAY
E1:-1 MULTIPLIZIEREN
E1:0 ADDIEREN
E1:1 AUFSUMMIEREN

```

ML16 MULTIPLIZIERT ODER ADDIERT (VERSION2) AUCH 2 ARRAYS
E1:-1 MULTIPLIZIEREN
E1:0 ADDIEREN

CALL(16,A(M),A(N),N,W1,W2,X,ENTSCH1,-1)

N:INDEXVARIABLE

ENTSCH1:-1 KLEINER (W1)

0 GLEICH (<=W2 UND >=W1)

1 GROESSER (W2)

2 UNGLEICH (<W1 ODER >W2)

X:TAUSCHWERT (WENN ALS KONSTANTE ANGEZEIGT ->KEIN TAUSCH)

AUFGABE:SUCHE VON A(N) BIS A(M) NACH WERTEN,DIE <,>=,<>

ALS W1,W2 SIND.

FALLS GEFUNDEN ,ERSETZE GEGEBENENFALLS DURCH X

UND KEHRE MIT INDEX DES GEFUNDENEN WERTES -1 IN N ZURUECK.

CALL(16,A(M),A(N),ENTSCH1,2)

BERECNE DIE FUNKTIONEN:

ABS ATN COS EXP INT LOG RND SIN SGN SQR TAN

3 12 10 1 4 2 13 9 6 7 11

=ENTSCH1

ML 17

CALL(17,S,Z,U,L1,L2,E)

E: 1 SPEICHERN

0 LADEN

-1 SUCHEN

-2 CLEAREN

BEI SPEICHERN/LADEN IN S/Z : ENDADRESSE

BEI SUCHEN: WENN GEFUNDEN IN LN1/LN2 DEZADRESSE DER BEFEHLE

U=0 : NICHT GEFUNDEN / U=1 : GEFUNDEN

(S,Z,U ALS VARIABLE ANGEZEIGT)

(DER LETZTE BEFEHL IM TEXT IST NICHT CLEAR-UND SPEICHERBAR)

ML 18

AUFRUF: CALL(18,ERSTE LINE-NUMBER, INCREMENT)

ML 18 NUMMERIERT BASIC TEXTE UM:

GEHT DERZEIT NUR BEI LINE-NUMBERS > 1000

SPRUNGADRESSEN KLEINER ALS DER PRIMAERE

ANFANG UND GROESSER ALS DAS PRIMAERE ENDE

UND SOLCHE ZU DENEN KEIN ZUGEHORIGES STATEMENT

GEFUNDEN WIRD, BLEIBEN UNVERAENDERT UND WERDEN

AUSGEDRUCKT : LINE-NUMBER -- SPRUNGADRESSE.

(EBENFALLS BEI RUECKSPRUNGEN (2000 GOTO 1010))

ES DUERFEN BELIEBIG SPACES IM TEXT STEHEN, AUSSER

BEI SPRUNGBEFEHLEN; HIER DUERFEN ZWISCHEN DEN

LETZTEN ZWEI CHARAKTEREN DES SPRUNGBEFEHLS (Z.B.

GOTO >TO) UND ZWISCHEN DEN ZIFFERN DER SPRUNG-

ADRESSE KEINE SPACES STEHEN.

ML 19

AUFRUF: CALL(19,Z,S\$,E1,E2)

ML 19 WANDELT DEZIMAL <---> HEXADEZIMAL

Z: FLOATING BASIC - VARIABLE

S\$: HEX.-ASCII ZEICHENKETTE (4 ZEICHEN!)

E2: 0 = HEX <---> DEZ

1 = DEZ ---> DEZ

E1: 0 = FLOATING BASIC ---> STRING

1 = STRING ---> FLOATING BASIC

Zu 3:

Für zeitunkritische Aufgaben und für Steuerzwecke wurden Programme in der Programmiersprache Basic geschrieben.

Hier sind zwei Blöcke zu unterscheiden:

a) Steuerteil

b) Unterrouتين ("Sofos")

Zu a)

Der Steuerteil bleibt während des ganzen Ablaufs immer im Kernspeicher. Er definiert die diversen Parameter, Variablen, Arrays etc., er dient zur Vorprogrammierung der Aufgabenabfolge, zum Laden von Unterrouتين, allgemein gesagt, zur Steuerung des Gesamtablaufs.

Er belegt die Line-Numbers 1-499 und 9600-9999.

Der Steuerteil zusammen mit dem Basic-Interpreter und den residenten Maschinenrouتين befindet sich auf der Diskette "Hauptsystem" und wird vor Beginn des Versuches zusammen mit den oben erwähnten Teilen in den Kernspeicher geladen.

Zu b)

Die Unterrouتين befinden sich auf der Diskette "Experimentalsystem". Diese wird nach Laden des "Hauptsystems" in den Drive 0 der Floppy-Disc gesteckt.

Der Drive 1 der Floppy-Disc dient der Datenabspeicherung.

Auf der Diskette "Experimentalsystem" mit insgesamt 77 Zylindern à 1664 16-Bit-Worten finden sich Basic-Unterprogramme, Korrekturdatensätze, das System "Kopf" und Reservespeicher. Die Unterprogramme werden je nach Bedarf in den Kernspeicher gela-

den. Nach Beendigung der Aufgabe werden sie automatisch wieder gelöscht.

Die Unterprogramme werden in den Line-Number-Bereich von 500-9508 geladen. Die Routinen liegen auf der Diskette von Zylinder 44 bis 76.

Ihre Aufgaben sind unter anderem folgende:

Bedienung der Digitaluhr, Steuerung des Verschlusses, Berechnung von Abtastpunkten und Behandlung von Datensätzen vor und nach der Fouriertransformation, Teilen, Mitteln u.ä. von Datensätzen, Korrekturvorgänge (Fotomultiplier, Quantenumrechnung etc.), Mittelung im Zeitbereich, Bestimmung der Winkelabhängigkeit von Sehzellen, Bedienung der Regelung, Datenerfassung nach der DAC-Methode und nach der Impulsgeber-Methode, Steuerung der automatischen Datentransferierung von und zur Floppy-Disc, Bereinigung von Datensätzen mit dem Potentiometergerät, Ausgabe auf dem 3-Linien-Schreiber, Bewertung der Nichtlinearität, Graphik und Speichern, Laden u.a. auf und von Floppy-Disc.

Die Korrekturdatensätze betreffen folgende Dinge:

Hanning-Fenster, X-Ablenkung für Graphik, Fotomultiplier-Korrektur, Frequenz-Wellenlängen-Umwandlung.

Hilfsprogramme zur Entwicklung von FIS wurden auf Lochstreifen abgelegt:

Kopieren von Disketten, Disassembler zur Analysierung des Basic-Interpreters, Lichtmessung, Ansteuerungsroutine für diverse Geräte (Regelung, Winkelabhängigkeitstester, Vortriebe), Zeitserienanalyse und Simulationen zu FIS, komfortable Graphikpakete.

Tabellarische Zusammenfassung zu Rechner- und Programmkomponenten:

Minicomputer Alpha-LSI von Computer Automation Inc., Rechner-

wortlänge: 16 Bit, 32k Kernspeicher

Floppy-Disc-Doppellaufwerk mit 121472 Worten Platz pro Laufwerk

Sichtgerät Vistar/GT mit 9600 Baud Transferrate

Graph typer DTC 302 T mit 450 Baud Transferrate für Druck und Plot

Schnelle Lese- und Stanzeinheit (von EECO)

XY-Schreiber (Esterline Angus)

OEM-Display-Scope (Wavetek)

3-Linien-Kompensationsschreiber

Basic-Interpreter (Nucleus und IOC)

1.6 Elektroden und Präparationsmethoden

Genaue Angaben über die Herkunft der Elektroden usw. finden sich am Ende des Kapitels. Als Ableitelektroden bei den verschiedenen Untersuchungsobjekten wurden für intra- und extrazelluläre Ableitungen hauptsächlich Glasmikropipetten verwendet. Glasröhrchen, die von der Herstellerfirma schon mit einer feinen Glaskapillare versehen waren, wurden auf entsprechende Länge gekürzt, in konzentrierter Schwefelsäure und dann in Wasser gereinigt und getrocknet.

Nach dem Ziehen mit einem Puller wurden die Elektroden mit 3molarer KCl gefüllt und unter einem Mikroskop optisch kontrolliert. Der Füllvorgang dauerte maximal eine halbe Stunde. Die Widerstände der Elektroden lagen zwischen 30 und 50 Megaohm. Glaspipetten, die für extrazelluläre Ableitungen bestimmt waren, wurden etwas gekürzt, um niedrigere Widerstände zu erzielen. Ihre Widerstände lagen im Bereich weniger Megaohm. Die Pipetten wurden vor dem Einpassen in den Halter am Schaft mit etwas Vaseline eingefettet, um ein Auslaufen des Elektrolyten unmöglich zu machen.

Gelegentlich wurden feine Silberdrähte als Ableitelektroden verwendet. Bei Calliphora wurden auch Versuche mit kohlenstoffbeschichteten Baumwollfäden unternommen, die auf das leicht geritzte Auge aufgebracht wurden. Sie ergaben Ableitungen mit etwas mehr Rauschen als bei den anderen Elektroden. Bei ERG-Untersuchungen wurden mit Glasmikropipetten die Ergebnisse mit dem geringsten Rauschpegel erzielt. Für die in Kapitel

2.4 erwähnten Humanmessungen fanden präparierte Haftschalen und Baumwollfäden Verwendung.

Insgesamt wurden bei den Tierversuchen drei verschiedene Präparationsmethoden angewandt.

Um sehr rauscharme Resultate zu erzielen, wurde die bekannte Methode des Dekapitierens (wie z.B. bei Meffert 1977) angewandt. Die indifferente Silberelektrode wurde nach Öffnung eines kleinen Loches im linken unteren Kopfteil eingesetzt. Sie diente auch als Kopfhalterung.

Zur Einbringung der Ableitelektrode wurde etwas von der Kutikula im rechten, hinteren, dorsalen Bereich abgetragen und die entstandene Öffnung durch aufgetragene Vaseline gegen Austrocknung geschützt. Abgeleitet wurde immer das rechte Auge.

Gewisse periodische und aperiodische Störungen (Spikes, Aktivitätswechsel, Potentialsprünge) treten gelegentlich bei den Ganztierpräparaten auf. Zur Verrechnung kamen nur Messungen, bei denen keine Zusatzaktivität auftrat. Bei diesen Präparationen wurden Flügel und Beine der betäubten Tiere entfernt. Der Thorax in diesen Regionen wurde mit Wachs bedeckt, wobei darauf geachtet wurde, die Stigmen unverschlossen zu lassen. Kopf, Thorax und Abdomen wurden durch Wachs miteinander verbunden und dadurch in ihrer Bewegungsfreiheit eingeschränkt. Die zwei Ganztierpräparationsmethoden unterscheiden sich dadurch, daß einmal die indifferente Elektrode im Thorax, im anderen Fall wie bei der ersten Methode im unteren linken Kopfbereich angebracht wurden. Sie diente in beiden Fällen zur Befestigung des Tieres. Die Thoraxmethode führt zu höherem

Rauschen. Sie fand nur bei den Ableitungen an Fuchs und Kohlweißling Verwendung, da hier ein Einbringen der indifferenten Elektrode in das Nachbarauge äußerst schwierig ist.

Die Ganztierpräparationen ermöglichen eine Überlebensdauer des Präparats von mehreren Stunden bis zu Tagen. Intrazelluläre Ableitungen bei diesen Präparationen können ohne Verlust der Stabilität des Ruhepotentials, der Antworthöhe und des DC-Anteils der Antwort bei Rechteckreizung mehrere Stunden dauern!

Bei den Schmetterlingen wurde aus anatomischen Gründen die Ableitelektrode von vorne eingeführt.

Ableitungen wurden an Fliegen der Art *Calliphora erythrocephala* aus der Zucht des Hauses vorgenommen. Alle Versuchstiere waren männlich und teils dem Wildtyp, teils der schirmpigmentlosen Mutante "Chalky" zugehörig.

Es wurden Tiere verwendet, die mit Leber gefüttert waren, aber auch solche, die mit Muskelfleisch herangezogen wurden. Sie bekamen also Vitamin-A-reiche bzw. -arme Nahrung.

Die Schmetterlingsversuche wurden am Kohlweißling (*Pieris brassicae*) und am kleinen Fuchs (*Aglais urticae*) durchgeführt, die aus der Zucht von Frau Dr. Kolb stammten.

Hierfür und für ihre rege Anteilnahme und Hilfe bei den Versuchen sei Frau Dr. Kolb gedankt.

Spezifikationen zum Kapitel 'Elektroden und Präparationsmethoden'.

Elektroden: Single Capillaries with inner Filament GC150-10 (Science Trading)

Elektrophysiologischer Vorverstärker mit Strompumpe und Brückenkompensation EVS-1

Kapillarziehgerät (Albrecht)

2. Ergebnisse

2.1. Testmessungen zur Prüfung der Methodik

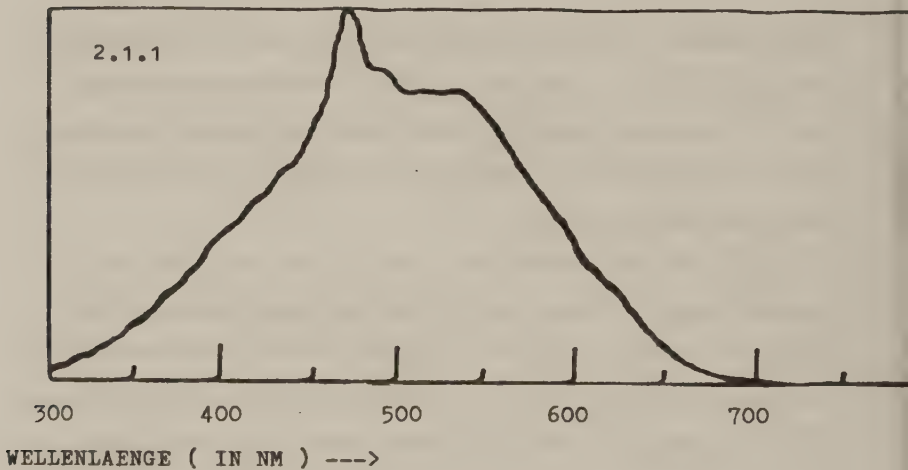
Im folgenden soll anhand verschiedener Beispiele gezeigt werden, wie es um die Wellenlängen- und Amplitudentreue von FIS momentan bestellt ist. Daran schließen sich Ausführungen über die Themenkreise Rauschen, Lampenkorrektur und Interferogrammform an.

Vorab noch einige Bemerkungen zur Art der grafischen Darstellung in diesem und in den nächsten Kapiteln. Die Spektren sind so skaliert, daß das Maximum des Datensatzes auf eins normiert ist. Die Eins bedeutet dabei relative maximale Spektraldichte. Die verwendeten Grafikprogramme, mit denen die dargestellten Spektren erstellt wurden, waren auf 8-Bit-DAC-Ausgabe zugeschnitten (256 Punkte Auflösung), so daß die Berechnungsdichte teils höher lag als die Dichte der grafischen Darstellung. Die Meßpunkte wurden durch ein Programm vektoriell miteinander verbunden. Die Dichte der Meßpunkte steigt methodisch bedingt bei sinkender Wellenlänge.

Die Ergebnisse der folgenden Seiten wurden mit der Regelung oder mit der DAC-Methode gewonnen.

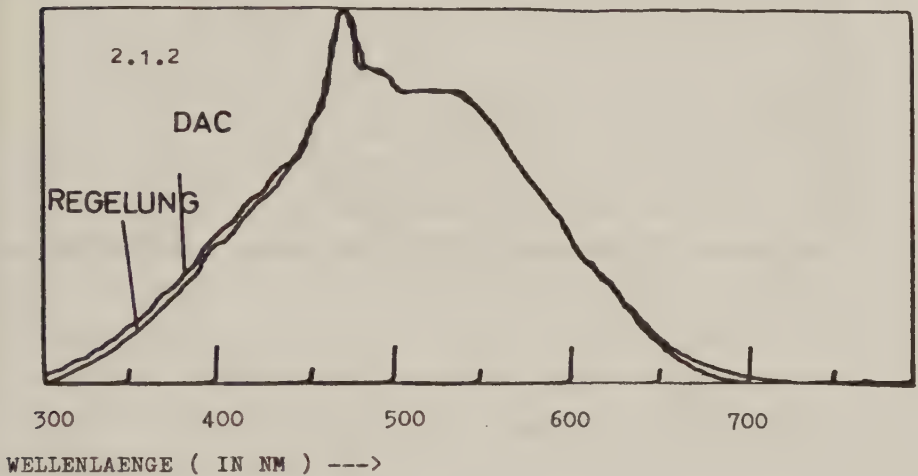
Die erste Abbildung (2.1.1) zeigt, wie es um die Reproduzierbarkeit der FIS-Messungen bestellt ist. Es handelt sich um zwei unkorrigierte, mit der DAC-Methode hintereinander gemessene Lampenspektren. Die Spektren sind nahezu deckungs-

gleich. Ob Restabweichungen ihre Ursache in Veränderungen des Lampenspektrums haben oder methodisch bedingt sind, ist noch nicht geklärt.

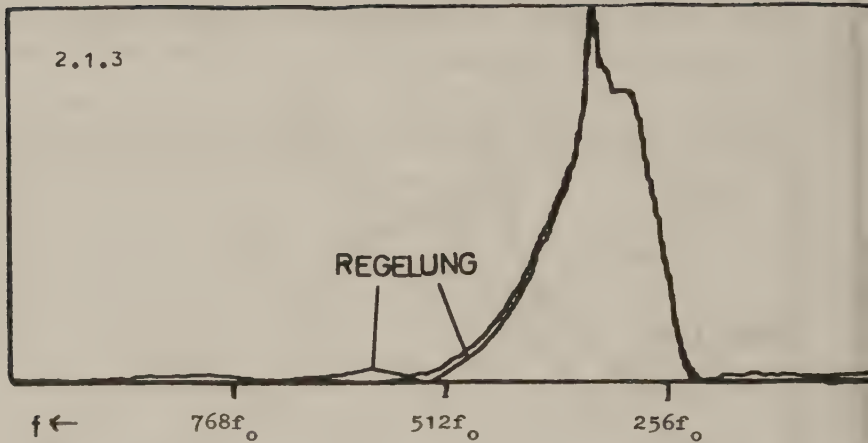


Die Ergebnisse mit der Regelung und die mit der DAC-Ausgabe unterscheiden sich etwas voneinander. Bei der Regelung war die Nachfolge des Vorgabecosinus noch nicht ideal verwirklicht, so daß gelegentlich je nach Justierung gewisse nichtlineare Verzerrungen der Cosinusmodulationen auftraten. Dies führt zu gewissen Verzerrungen im Spektrum und zu einem kleinen nichtlinearen Beitrag, der aber frequenzmäßig außerhalb des Meßbereichs zu liegen kommt. Die Abbildung 2.1.2 zeigt unkorrigierte Lampenspektren, die mit der DAC-Methode und mit der Regelung gewonnen wurden. Ob sich das Lampenspektrum zwischen diesen zwei zeitlich getrennten Messungen verändert hat (leichte Veränderungen in der Abbildung des Lam-

penbogens) ist nicht bekannt. Da bei biologischen Experimenten das Lampenspektrum am Ende des Lichtleiters mitbestimmt wurde, fehlte die Notwendigkeit, dieser Frage genauere Beachtung zu schenken.



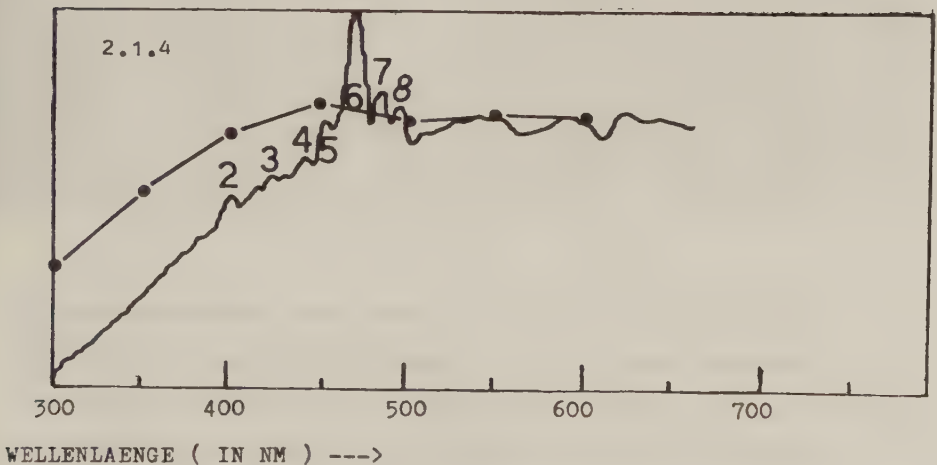
Die Abbildung 2.1.3 zeigt dieselben Spektren wie Abbildung 2.1.2 mit dem Unterschied, daß noch keine Frequenz-Wellenlängen-Transformation durchgeführt wurde. Sie zeigt also die Frequenzverteilung des Lampeninterferogramms. Man achte auf die Nichtlinearität im oberen Frequenzbereich bei dem mit der Regelung erzielten Spektrum.



Als nächstes soll eine Reihe von Spektren verschiedener Lampen, Filter und Testlösungen im Vergleich zu Betriebskurven und ähnlichem zeigen, wie präzise die Methodik von FIS ist. Die Bestimmung der Filter und der Lösung erfolgt mit zeitlich hintereinander gelegenen Messungen (mit Filter/ohne Filter etc.).

Die Abbildungen 2.1.4. und 2.1.5 zeigen im Vergleich die von uns gemessene Xenon-Lampe und ein Spektrum von der Herstellerfirma. Die Zahlen in den Grafiken zeigen die einander zugeordneten spektralen Komponenten. Die eingezeichnete Kurve in Abbildung 2.1.4 (●-●-●) ist die Verbindungslinie von Meßwerten aus der Abbildung 2.1.5. Amplitudenmäßig weichen die zwei Kurven also im Bereich unterhalb von 450 nm und

oberhalb von 600 nm voneinander ab. Wellenlängenmäßig stimmen die zwei Kurven genau überein. Die Amplitudenabweichungen haben zwei Ursachen. Die Abweichung im kurzwelligen Bereich erklärt sich aus den optischen Eigenschaften des Systems (Transmissions- und Reflexionsvermögen des Strahlenteilers). Da aber nur das tatsächlich auf das biologische Objekt einwirkende Spektrum bestimmt wird, spielt diese Veränderung des wahren Lampenspektrums durch die Optik keine Rolle. Die Veränderung im Langwelligen erklärt sich aus der rasch steigenden Unempfindlichkeit des Fotomultipliers in dieser Region. Korrekturen oberhalb von 600 nm sind also momentan mit einer gewissen Unsicherheit behaftet. Ein anderer Multiplier kann diese Unsicherheit beenden.



OSRAM

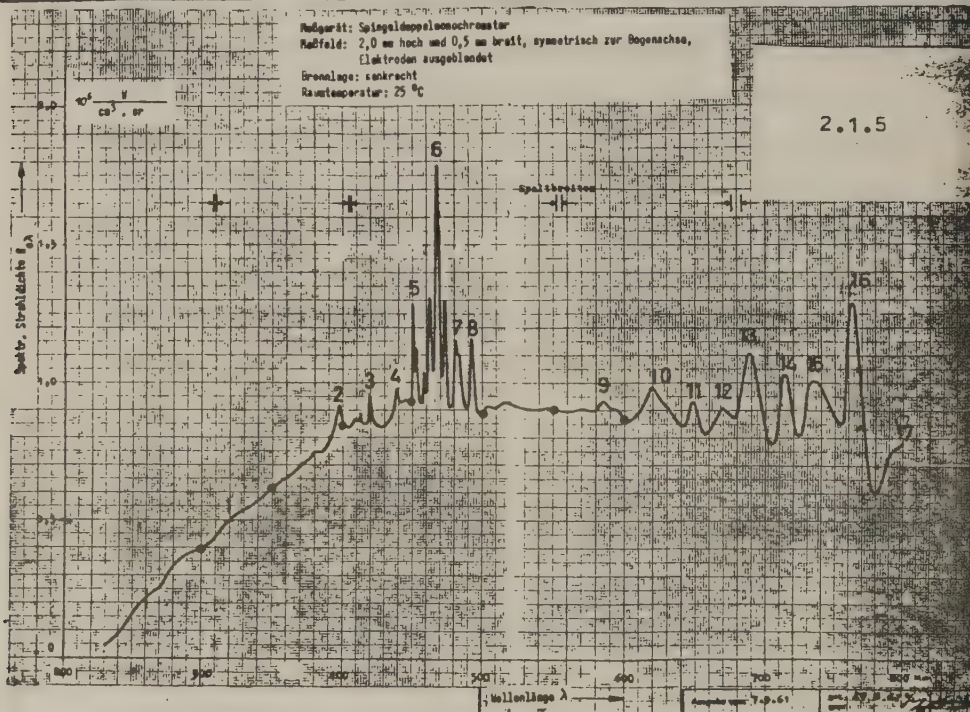
Gesellschaft mit beschränkter Haftung

Spektrale Strahlungsverteilung der

OSRAM - Xenon-Hochdrucklampe XBO 150 W im UV- und im sichtbaren Bereich
bei Nennleistung

Reflektor: Spiegeldoppelmantelchromator
Refeld: 2,0 mm hoch und 0,5 mm breit, symmetrisch zur Bogenachse,
Elektroden ausgeblendet
Grenzlage: senkrecht
Raumtemperatur: 25 °C

2.1.5

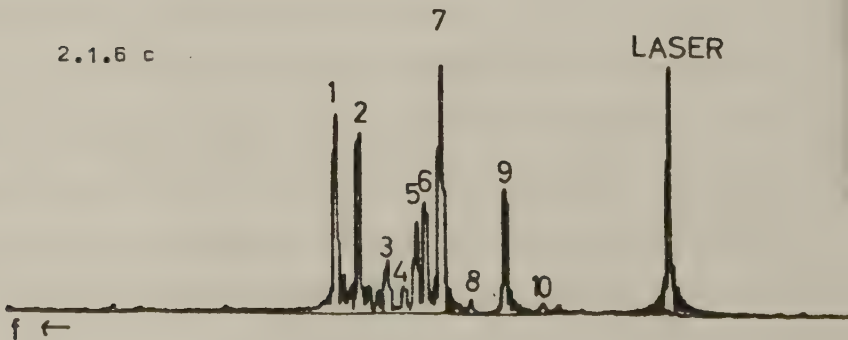
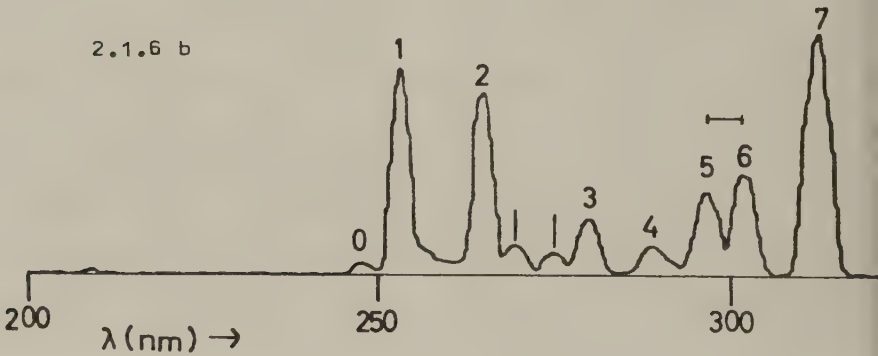
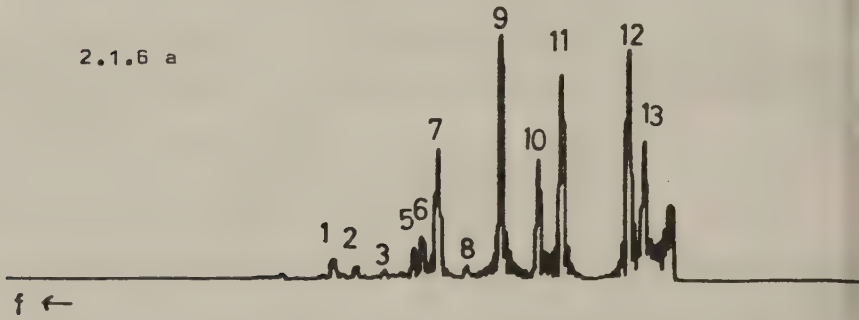


Bei diesem und den folgenden Vergleichen ist natürlich zu beachten, daß die Unterschiede ihre Ursache auch in Differenzen der Lampenspektren haben können. Die Auflösungen bei den Gegenüberstellungen sind auch nicht identisch. Bei den Messungen mit der Regelung z.B. ist der maximale Fahrweg, der die Auflösung festlegt, gleich 72λ . Dabei wird die Struktur 6 in Abbildung 2.1.5 noch nicht weiter aufgelöst.

Die Abbildungen 2.1.6 und 2.1.7 zeigen im Vergleich die Spektren einer Quecksilber-Linienlampe. Die Abbildung 2.1.6 a zeigt ein FIS-Spektrum (mit der Fotomultiplier-Kennlinie korrigiert, aber anders als beim Xenon-Lampen-Spektrum keine $\Delta\lambda$ -Korrektur; siehe unten). Bei den Spektren 2.1.6 b und 2.1.6 c wurde zur Erhöhung des relativen UV-Anteils ein Interferenzfilter (Baird Atomic, $\lambda_{\max} = 265 \text{ nm}$) in den Strahlengang gebracht. Bei 2.1.6 a und 2.1.6 c wurde keine Frequenz-Wellenlängen-Transformation durchgeführt, um den Spektralbereich von 158,2 nm bis ins Infrarote ganz zu zeigen. Die Übereinstimmung mit der Herstellerkurve in der Frage der Wellenlängentreue wurde auch numerisch geprüft und stellte sich als exakt heraus. Die Amplitudenabweichungen haben dieselben Ursachen wie bei der Xenon-Lampen-Bestimmung. FIS ist also im Spektralbereich von zumindest 250 nm bis 1100 nm (siehe unten) eine präzise Methode. Gewisse Verbesserungen (Quarzstrahlenteiler, neuer Fotomultiplier) werden eine hohe Annäherung an die wahren Spektren auch ohne Korrekturen ermöglichen.

Beim Spektrum 2.1.6 b wurde ein Hanning-Fenster verwendet, das die Auflösung um den Faktor 2 vermindert, aber die Seitenschwingungen verhindert. Die Strukturen 5 und 6 sind 5 nm voneinander entfernt. Die theoretische Rayleigh-Auflösung beträgt 1 nm. Die Elemente 5 und 6 wären selbst bei doppelt so naher Lage noch separierbar (2,5 nm). Unter Berücksichtigung der Auflösungsverminderung durch das Hanning-Fenster stimmen also theoretische und gemessene Auflösung

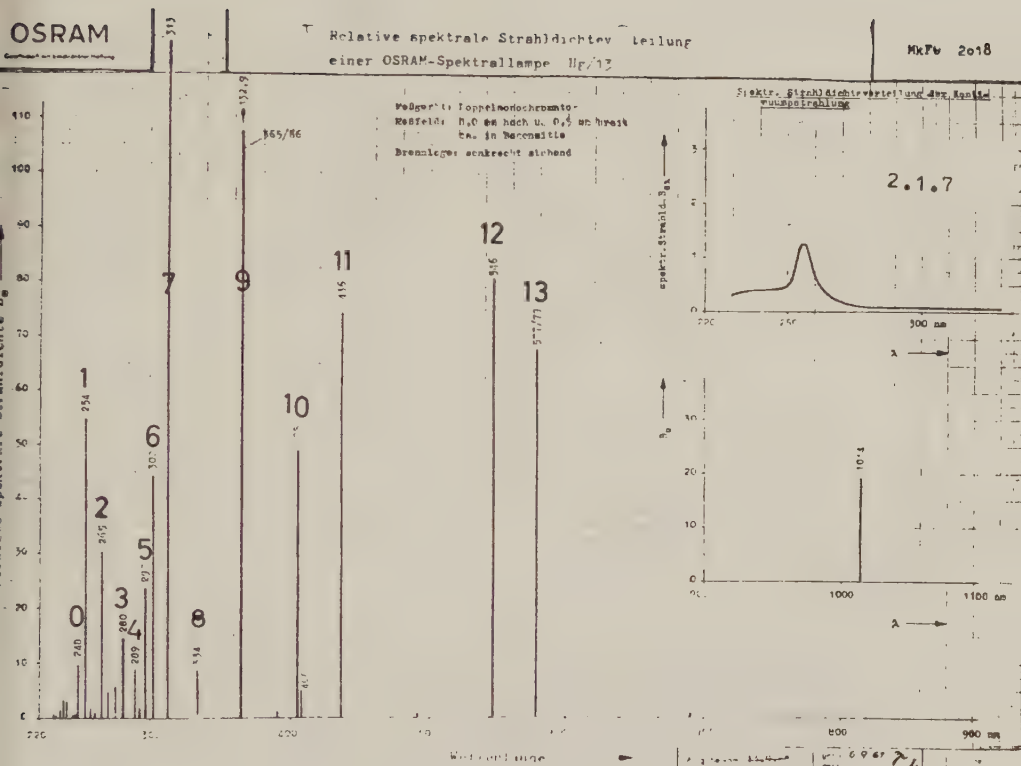
überein (2 nm bzw. 2,5 nm). Die Spektren 2.1.6 b und 2.1.6 c wurden nicht weiter korrigiert.



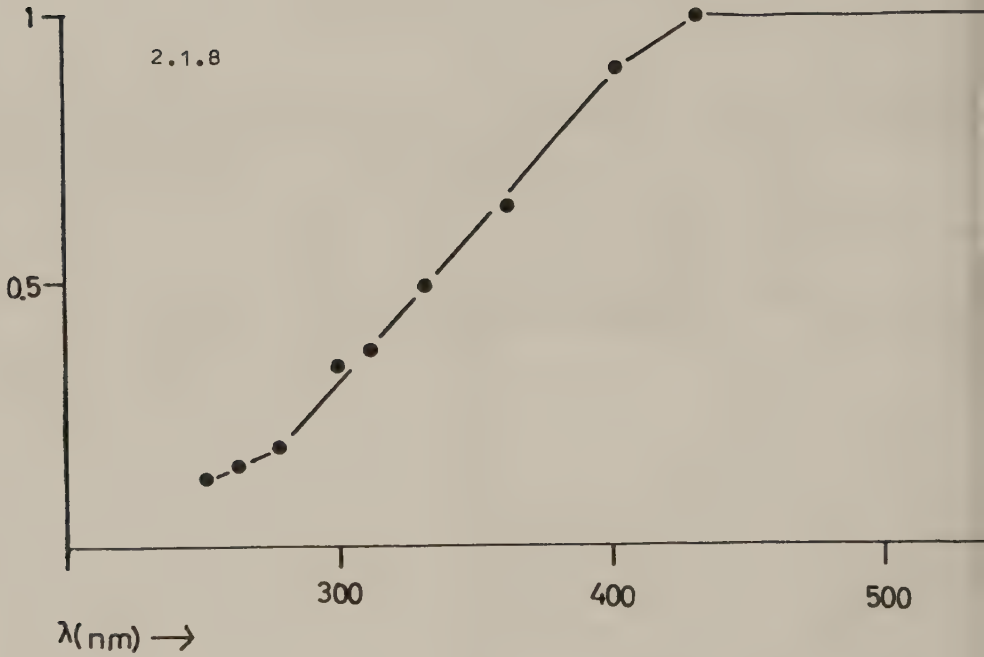
OSRAM

Relative spektrale Strahldichte-Teilung
einer OSRAM-Spektrallampe Hg/13

MkPb 2018



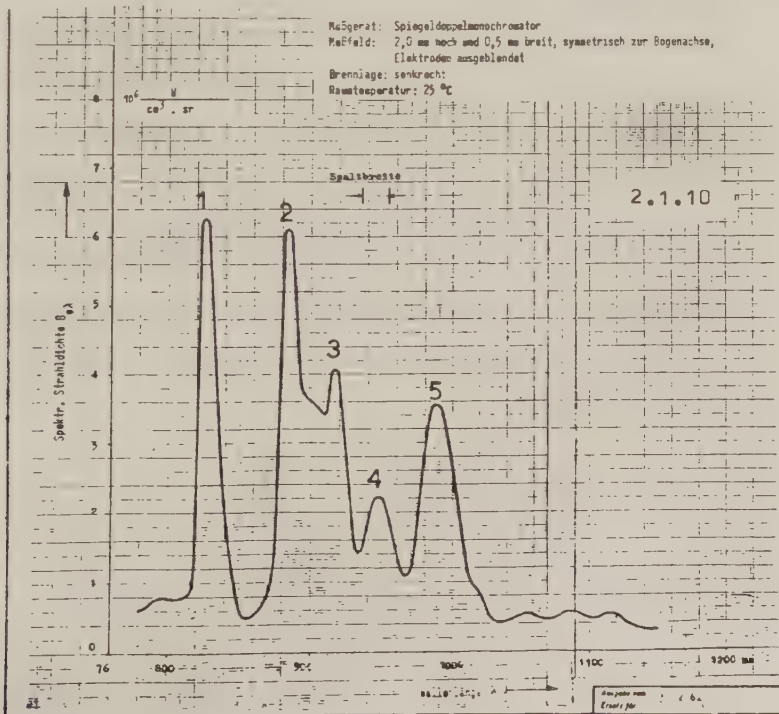
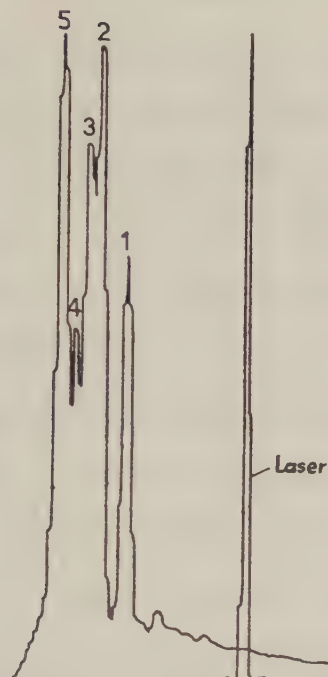
Die Abbildung 2.1.8 zeigt die Abweichung von der FIS-Messung im Amplitudenbereich von der Kurve, wie sie der Hersteller der Hg-Lampe angibt (2.1.6 a gegenüber 2.1.7).



Die Abbildung 2.1.9 zeigt noch einmal das Spektrum einer Xenon-Lampe, das aber diesmal mit einem im Infraroten empfindlicheren Fotoelement gemessen wurde. Eine Korrektur mit dessen spektraler Kennlinie fand nicht statt. Wie man aus dem Vergleich mit dem Spektrum 2.1.10 ersehen kann, sind Messungen ins Infrarote bis mindestens 1100 nm möglich.

2.1.9

f →



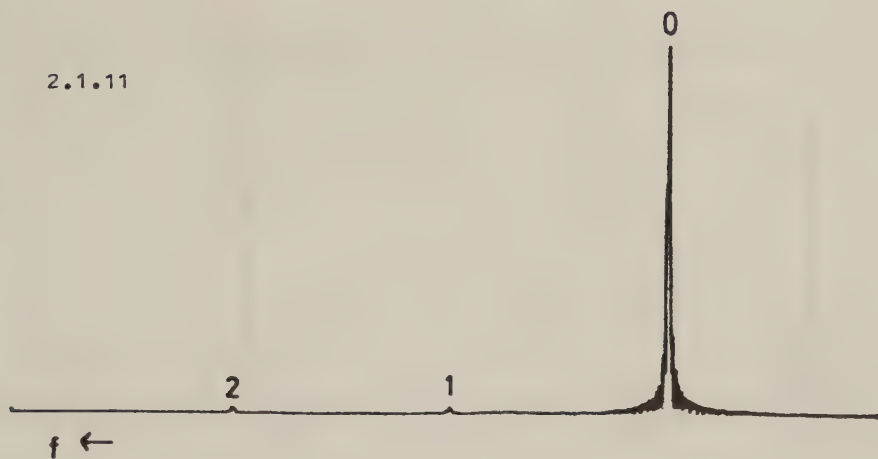
Die Abbildungen 2.1.11 und 2.1.12 zeigen Spektren des monochromatischen Lichtes eines Helium-Neon-Lasers. Die gemessene Wellenlänge stimmt wie bei den vorigen Lampenspektren bei numerischer Betrachtung wieder exakt, was zeigt, daß die Interferometerfunktion, die Meßwerterfassung und die Datenverarbeitung in Ordnung sind.

Das erste Spektrum ist mit einem Rechteck-Fenster, das zweite mit einem Hanning-Fenster bewertet. Wie in Kapitel 1.3 erläutert, führt das Rechteck-Fenster zu seitlichen Schwingungen. Die Spektren wurden mit der Regelung gemessen. Man achte auf die nichtlinearen ersten und zweiten harmonischen Schwingungen. Die Frequenzskala ist wie bei der früheren Abbildung 2.1.3 linear. Das heißt, daß der Wert am Ende der Abszisse ($\neq f$), der doppelten Frequenz des Wertes, der sich in der Mitte befindet, zugeordnet ist.

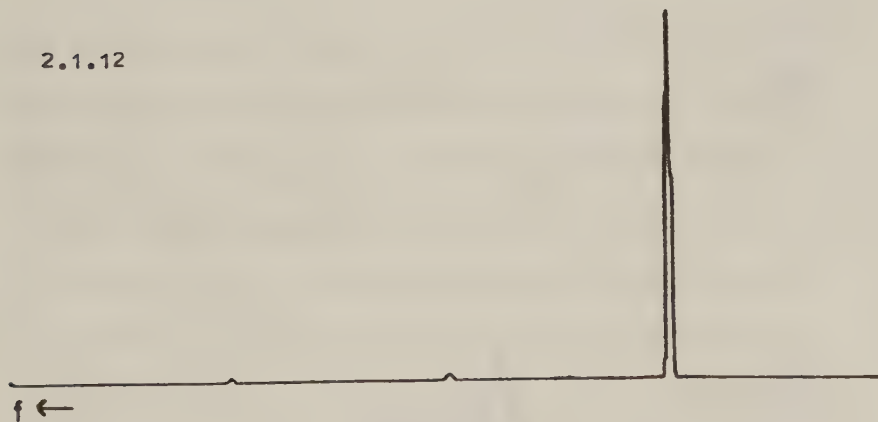
Die Fouriertransformationsgröße war standardmäßig 2048 Werte, d.h. 1024 Frequenzpunkte. Da die Regelung $\lambda/8$ -Impulse liefert, ist die Frequenz $1024f_0$ der Wellenlänge 158,2 nm zugeordnet. f_0 ist der Kehrwert der Gesamterfassungszeit T .

Die Spektren 2.1.13 und 2.1.14 unterscheiden sich von ihren zwei Vorgängern dadurch, daß hier die Wellenlängen-Frequenz-Transformation vorgenommen wurde. Es zeigt sich deutlicher der Auflösungsverlust bei der Verwendung des Hanning-Fensters (Halbwertsbreite).

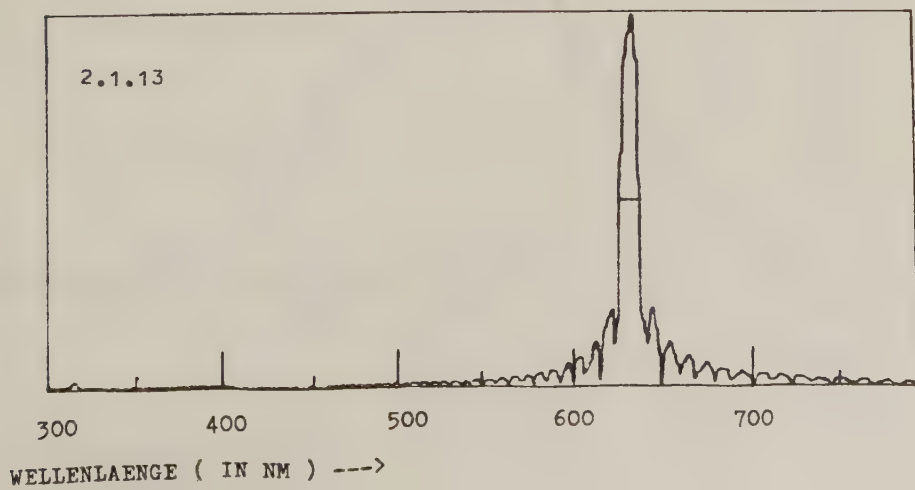
2.1.11

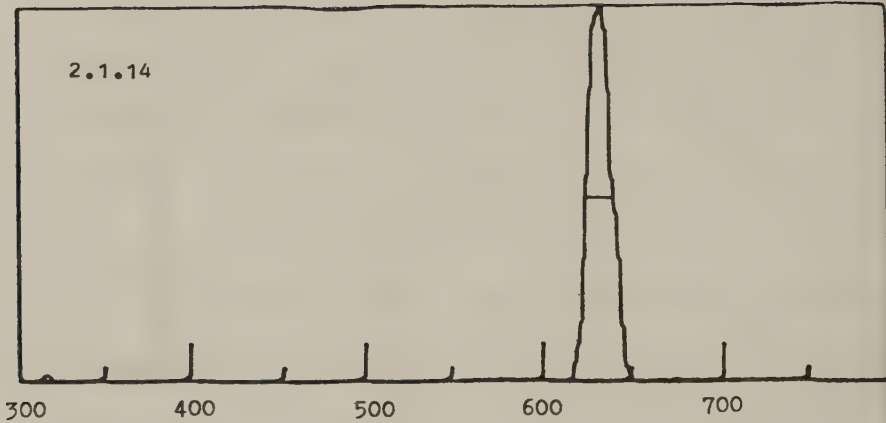


2.1.12

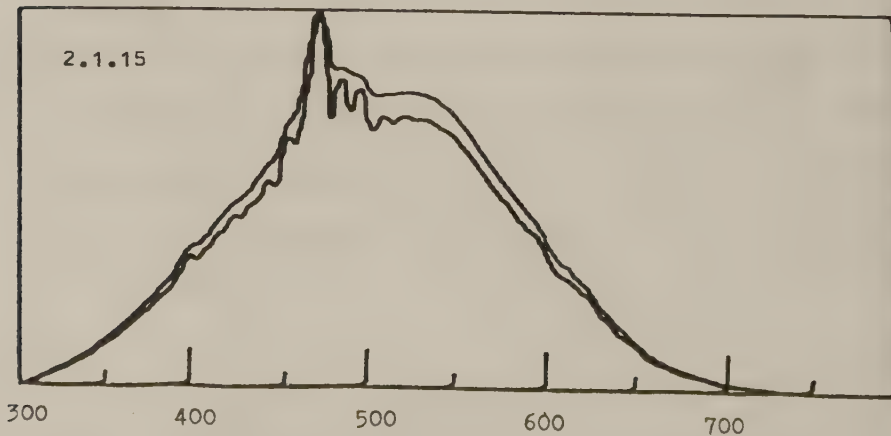


2.1.13



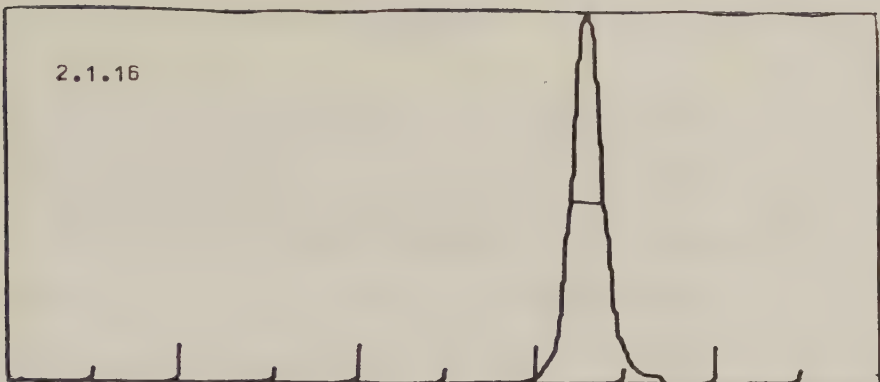


Die Abbildung 2.1.15 zeigt noch einmal den Einfluß des Hanning-Fensters auf Spektren, diesmal auf das der Xenon-Lampe. Die unterschiedliche Höhe darf nicht irritieren, da aufgrund der auflösungsvermindernden Wirkung des Hanning-Fensters die Schärfe des Haupt-Peaks vermindert wird, und da auf das Maximum skaliert wird, erhöht sich relativ zur Höhe des Peaks das Restspektrum.



WELLENLAENGE (IN NM) ---->

2.1.16



Die Abbildungen 2.1.16 und 2.1.17 zeigen das von uns gemessene und das von der Herstellerfirma gelieferte Transmissionsspektrum eines Interferenzfilters.

Der gemessene und der angegebene maximale Durchlaßwert von 628 nm stimmen exakt überein. Die Halbwertsbreiten stimmen bei Berücksichtigung der Auflösungsverminderung durch das Handling-Fenster bei 2.1.16 ebenfalls überein.

50%

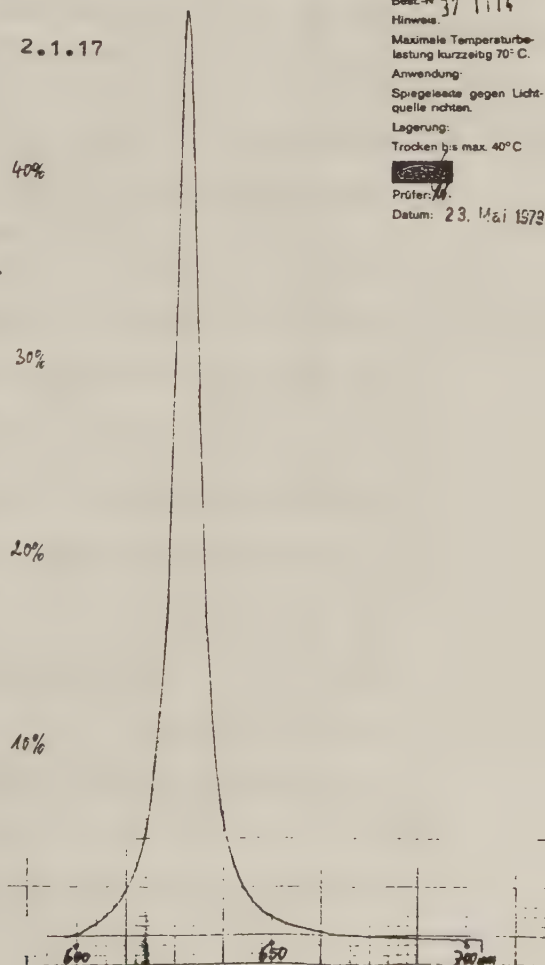
2.1.17

40%

30%

20%

10%



INTERFERENZFILTER

$\lambda_{\text{max}} = 633 \text{ nm} \pm 1\%$

Best.-N. 37 1114

Hinweis:

Maximale Temperaturbelastung kurzzeitig 70° C.

Anwendung:

Spiegelende gegen Lichtquelle richten.

Lagerung:

Trocken bis max. 40° C

Prüfer: M.

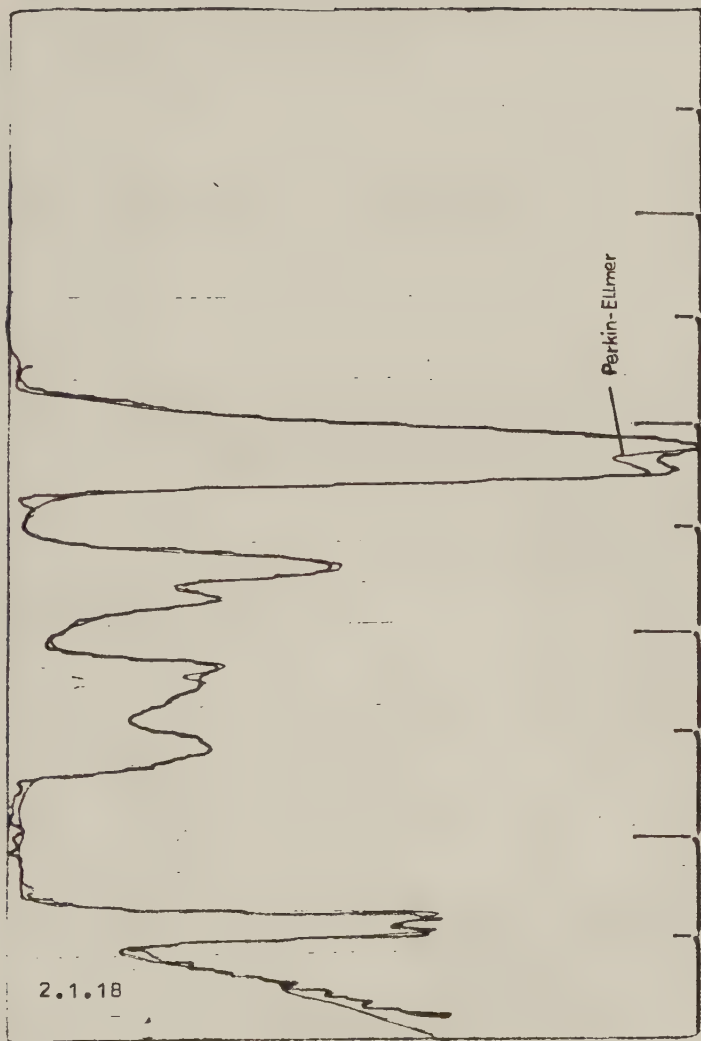
Datum: 23. Mai 1979

Diese und die anderen Messungen stellen nur eine kleine Auswahl der Testmessungen dar. Es traten nie, gleichgültig in welchem Spektralbereich, irgendwelche unerklärlichen Abweichungen zu den erwarteten Spektren auf.

Die Abbildungen 2.1.18 und 2.1.19 zeigen Transmissionskurven des Farbfilters BG 20. Unser BG 20-Filter wurde freundlicherweise von der Firma Perkin-Ellmer mit einem Monochromatorsystem nachgemessen^x. Das Ergebnis dieser Messung ist in den zwei Abbildungen eingetragen. Beim Spektrum 2.1.19 wurde im Gegensatz zu 2.1.18 ein Hanning-Fenster verwendet. Der Vergleich der FIS-Messung mit der Kurve von Perkin-Ellmer in Abbildung 2.1.18 zeigt die hohe Übereinstimmung der beiden Messungen. Die leichten Störungen auf dem FIS-Spektrum entstehen durch die Verwendung des Rechteck-Fensters, da das Interferogramm hier am Ende des 72λ langen Weges noch kräftige Modulationen zeigt. Die Verwendung eines Hanning-Fensters beseitigt diese Störungen. Dabei verschwinden aber wegen der geringeren Auflösung die feineren Strukturen, und ähnlich wie bei Spektrum 2.1.15 führt das Hanning-Fenster wegen seiner verschleifenden Wirkung zur relativen Abschwächung bestimmter Strukturen im Spektrum. Noch höhere Übereinstimmung mit dem Perkin-Ellmer-Spektrum wäre also bei einem größeren Spiegelweg, als er momentan möglich ist, bei gleichzeitiger Verwendung eines Hanning-Fensters erzielbar.

Spezifikationen dieses und anderer Filter sowie der verwendeten Lampen finden sich in Kapitel 1.4.

^x UV/VIS-Zweistrahl-Spektrophotometer 550



2.1.18

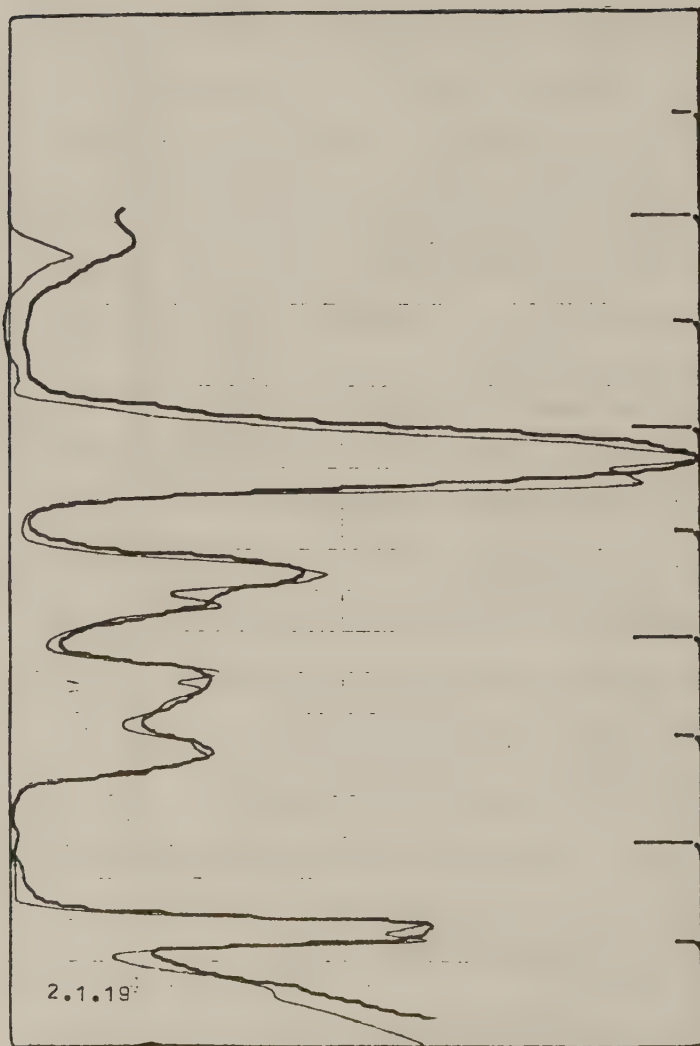
Time 20 40 60 80
 Sol. 1.000: 100% n.p. 1.0
 100% n.p. 1.0
 100% n.p. 1.0

100% n.p. 1.0

100% n.p. 1.0

20

20



810

730

600

470

400

300

10.1.19. 10.1.19. 10.1.19.

0.1.19.

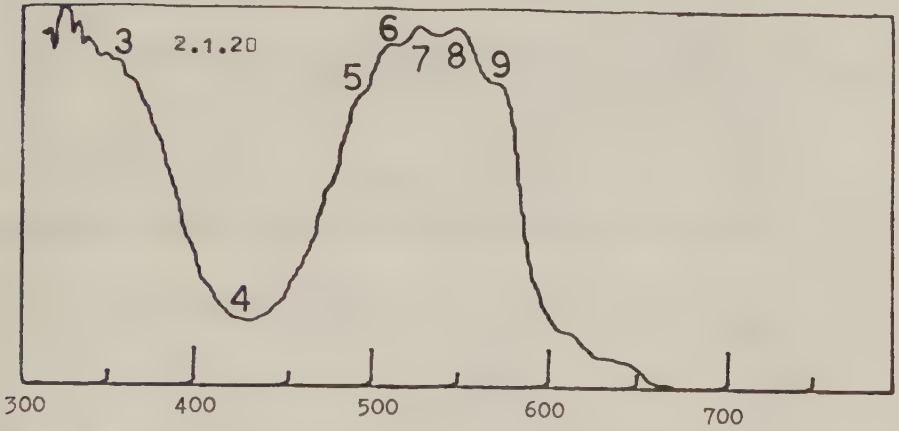
0.1.19.

0.1.19.

0.1.19.

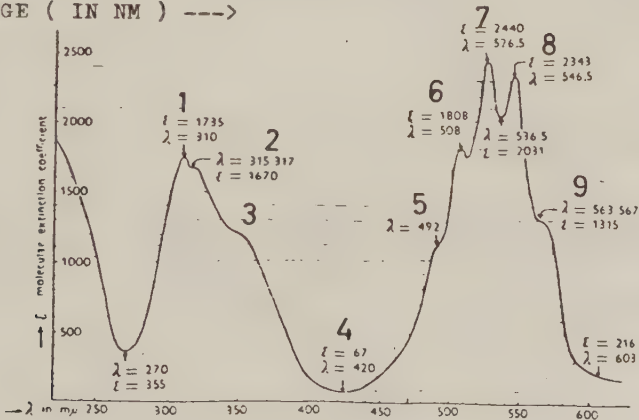
0.1.19.

Die Abbildungen 2.1.20 und 2.1.21 zeigen vergleichend Absorptionsmessungen einer Kaliumpermanganat-Lösung. Bei 2.1.20 handelt es sich um die Absorption, bei 2.1.21 um die Extinktion (Logarithmus!).



WELLENLAENGE (IN NM) ---->

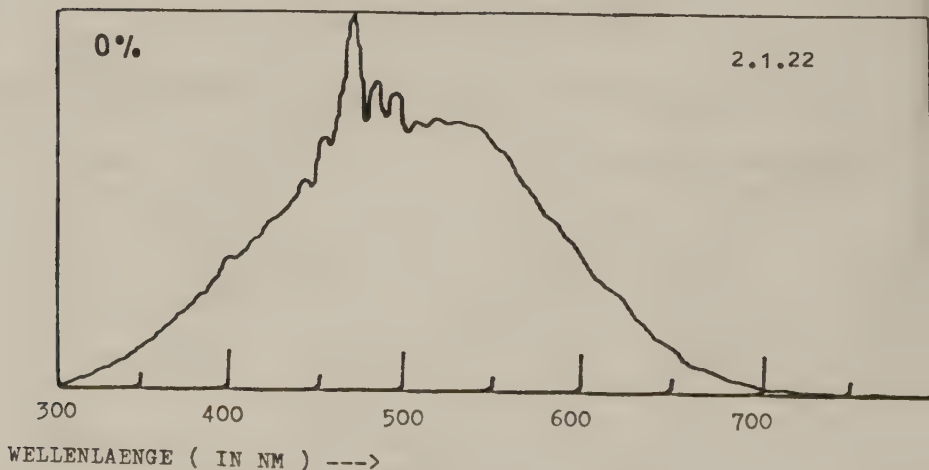
2.1.21

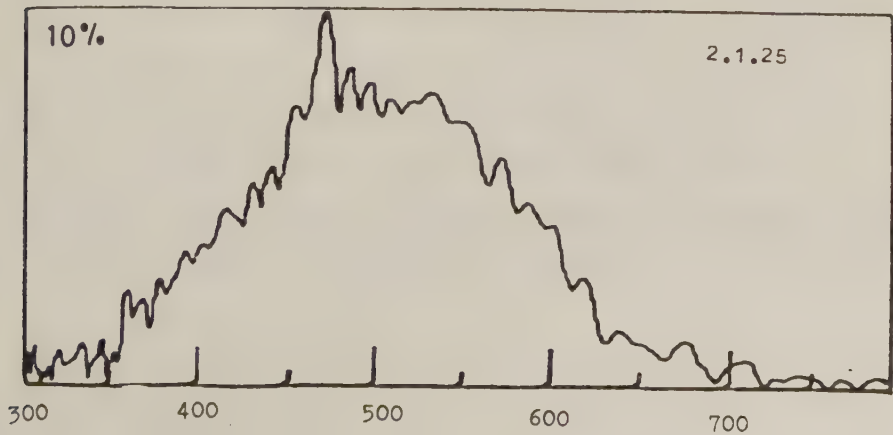
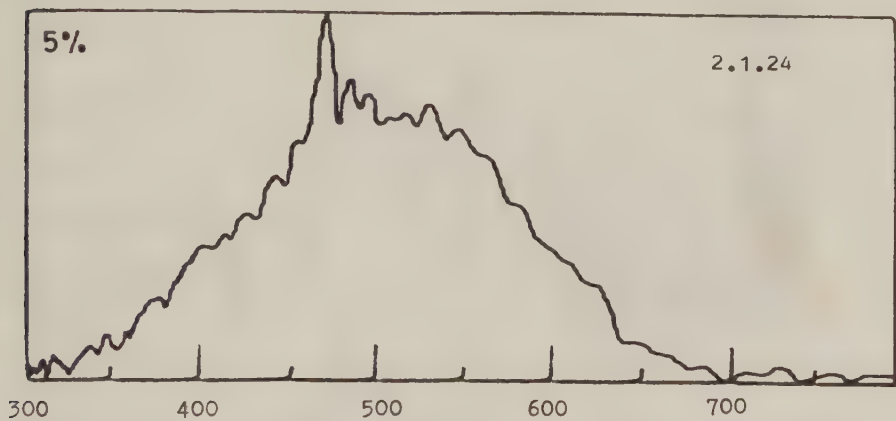
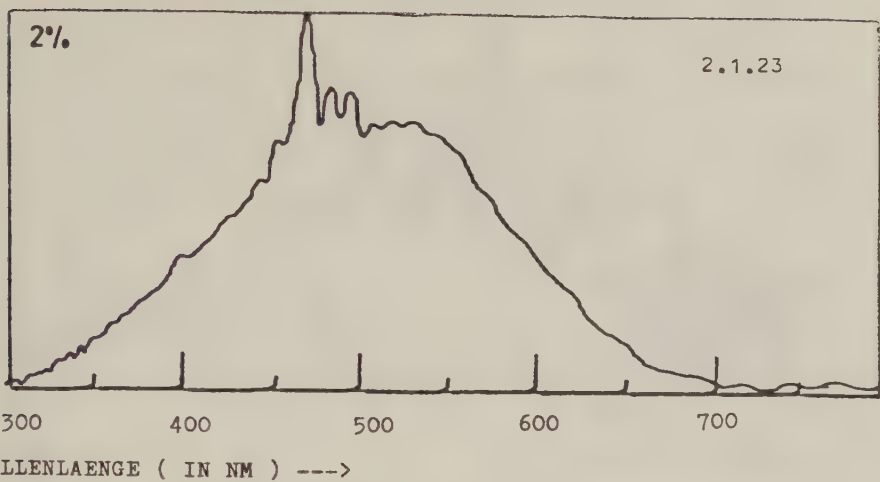


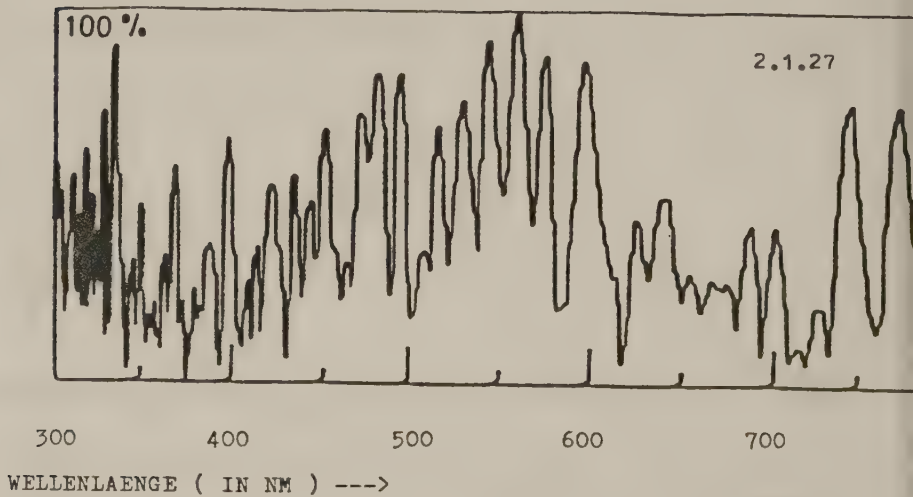
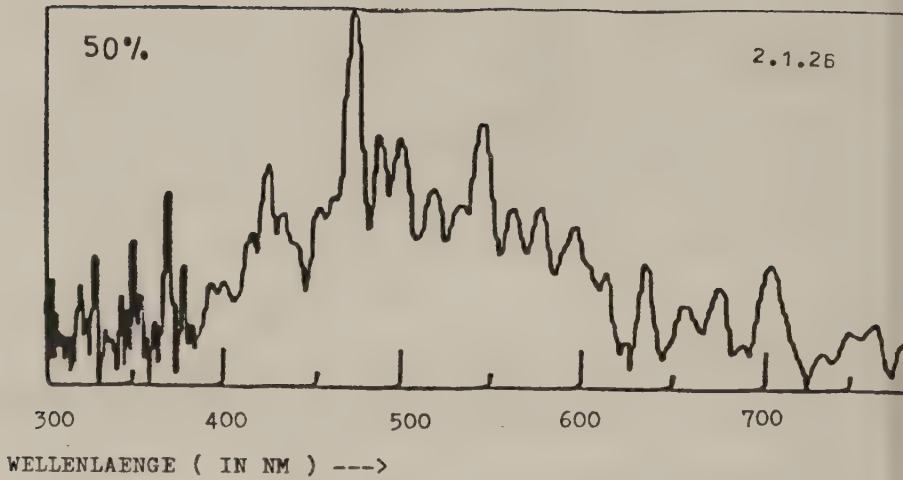
Die folgenden Abbildungen 2.1.22 bis 2.1.27 zeigen den Einfluß des Rauschens auf die Spektren: Über eine Summierschaltung wurde auf das durch Bandpässe rauschreduzierte Interferogramm der Lampe das Rauschen eines "White-Noise"-Generators addiert. Die Signal-Rausch-Verhältnisse bei den folgenden Spektren betragen:

100 : 0, 100 : 2, 100 : 5, 100 : 10, 100 : 50, 100 : 100.

Bei einem schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis als 100 : 10 werden die erhaltenen Spektren zweifelhaft in ihrer Aussagekraft. Die Signalstärke 100 ist die Interferogramm-Amplitude in der Weißlichtposition. Die Rauschamplitude wurde bei sehr kleiner Zeitablenkung des Oszilloskops eingestellt.

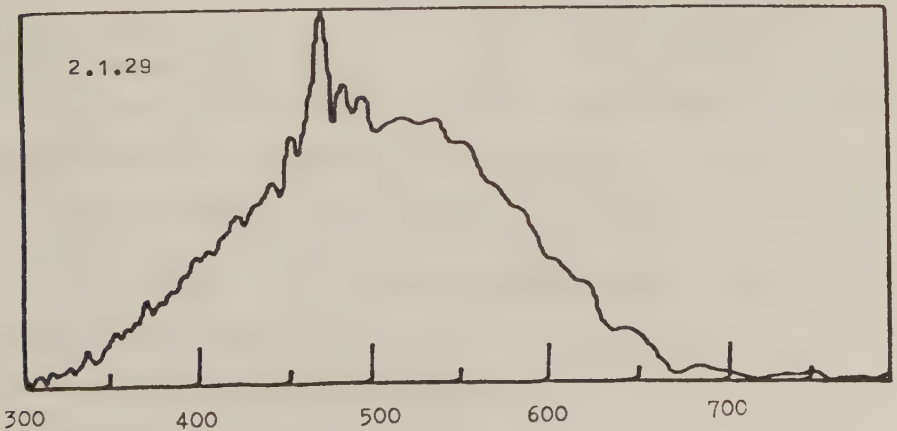
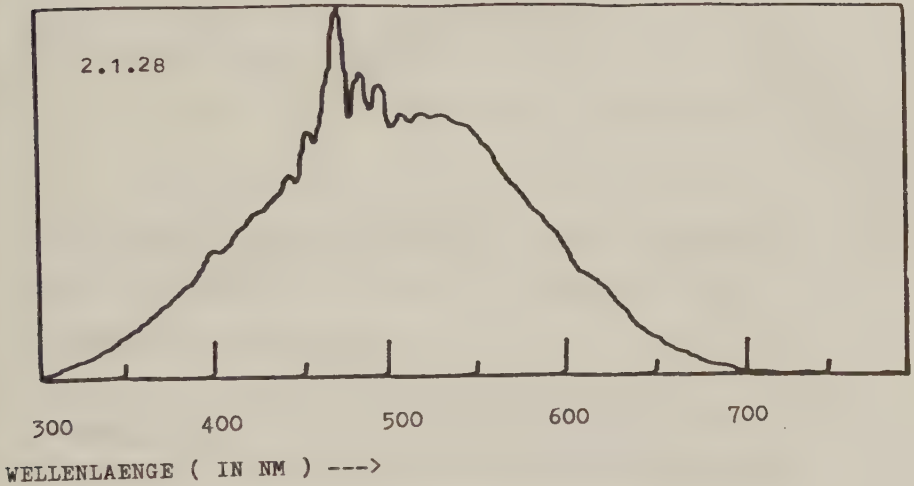






Die Nichtbeeinflussung der Spektren durch die Bandpässe wird durch die Abbildungen 2.1.28 und 2.1.29 demonstriert, die unkorrigierte Lampenspektren mit und ohne Filterung zeigen. Nur das Rauschen, nicht das Spektrum wird durch unsere Filterung beeinflusst. Das leichte Rauschen in Abbildung

2.1.29 (Rauschen des Fotomultipliers) zeigt, daß Verbesserungen im Versuchsaufbau noch möglich sind (Lage des Multipliers, rauschärmerer Multiplier). Die Einstellung der Bandpässe wurde mit einem Sinus-Generator überprüft.



Die Rauschstärke der zwei Ketten

Fotomultiplier-Verstärker-Paß-ADC

bzw. Biologisches Objekt-Verstärker-Paß-ADC

wurde numerisch überprüft und führte zu folgenden Ergebnissen:

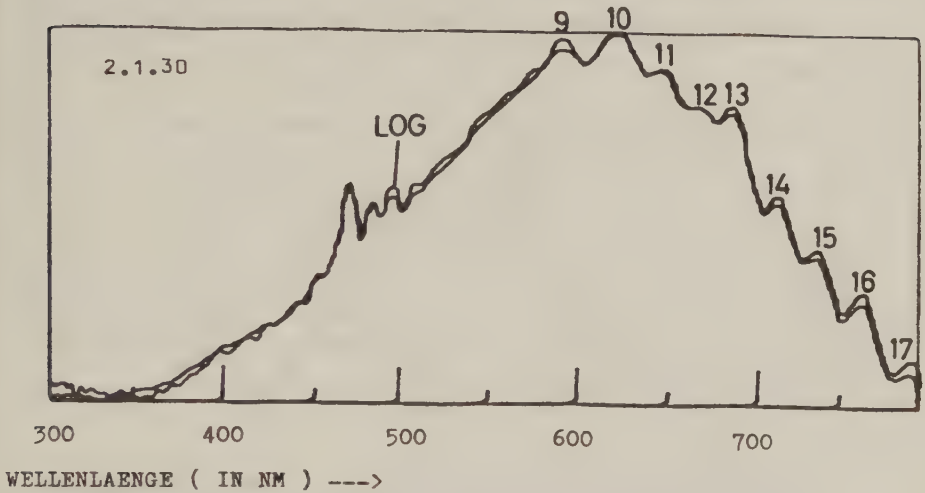
Lampenmessung		biologische Messung
		(hier: ERG bei Chalky)
Dunkelrauschen	max. 0,5 %	max. 3 %
Hellrauschen	max. 1 %	max. 2 %

(bezogen auf die maximale Signalstärke = 100 %)

Diese Angaben sind, da es sich um eine einmalige Stichprobe handelt, natürlich nur eine grobe Schätzung.

Die Abbildung 2.1.30 zeigt, daß die Form des Spektrums durch geringere Nichtlinearitäten nicht beeinflusst wird: Auf ihr werden zwei Xenon-Lampen-Spektren dargestellt, die mit einem Fotoelement (UV enhanced) gemessen wurden. Das Signal des Elements wurde einmal mit der normalen Strom-Spannungs-Wandlungsschaltung verstärkt, das anderemal wurde nur die Fotoelementspannung verstärkt. Dabei ist der Zusammenhang zwischen Intensität und verstärktem Signal logarithmisch. Da sich eine Logarithmusfunktion als Summe verschiedenfrequenter Sinusschwingungen darstellen läßt (Reihenentwicklung), läßt sich die Grundschiwingung, die hier anteilmäßig die größte ist, mit dem Normalspektrum (Stromverstärkung) vergleichen. Die Lampenspektren sind nicht mit der spektralen

Kennlinie des Fotoelements verrechnet worden.

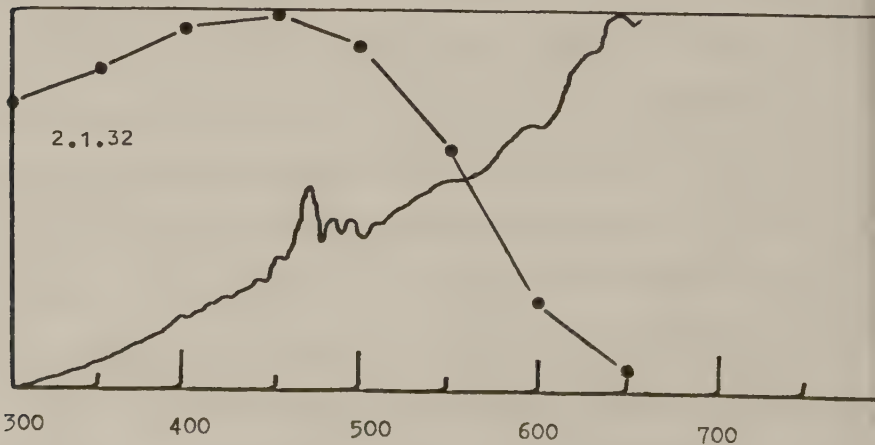
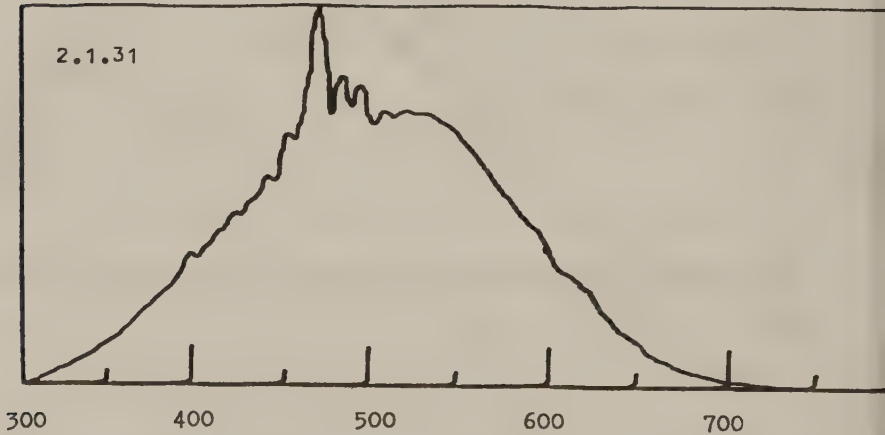


Nun folgen Anmerkungen zur Lampenkorrektur: Bei der Berechnung der spektralen Empfindlichkeit muß, wie in Kapitel 1.1 gezeigt, eine Korrektur des Lampenspektrums vor der Division mit Zellantwortspektrum stattfinden. Die erste Korrektur betrifft die spektrale Kennlinie des Fotomultipliers. Das unkorrigierte Lampenspektrum wird durch diese Kurve (●-●-● in Abbildung 2.1.32) geteilt. Weiterhin wird die Energieordinate (relative Spektraldichte) in eine relative Quantenzahlordinate über die Beziehung $E_q = h\nu$ umgewandelt. Die Abbildungen 2.1.31 bis 2.1.33 zeigen die zwei Korrekturen: unkorrigiertes Lampenspektrum - 1. Korrektur - 2. Korrektur.

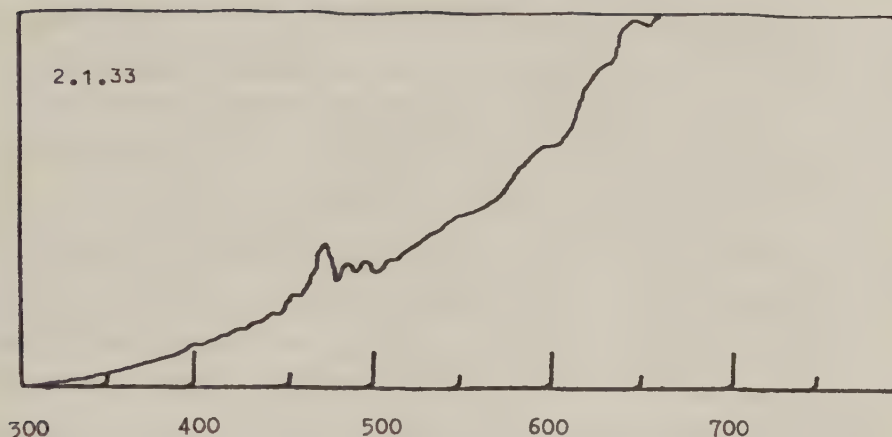
Untersuchungen zur Bestimmung des spektralen Ganges des Fotomultipliers fanden statt. Da die Ergebnisse im Rahmen der Angaben lagen, die der Hersteller zur spektralen Emp-

findlichkeit macht, wurden diese verwendet.

Die Division des Zellspektrums durch das zweifach korrigierte Lampenspektrum liefert die spektrale Empfindlichkeit.



WELLENLAENGE (IN NM) ---->



Die Datenerfassung, die Spektralanalyse und die diversen Korrekturen und Verrechnungen werden automatisch abgewickelt (Kapitel 1.5). Die üblichen Rechenzeiten nach der Erfassung (vom Laden der Daten von Diskette bis zur Ausgabe auf einem XY-Schreiber) liegen in der Größenordnung von 5 Minuten.

Das Licht, das auf das biologische Objekt, und das Licht, das auf den Fotomultiplier fällt, unterscheidet sich nur dadurch, daß es an einem Quarzplättchen das einmal hindurchgelassen, das anderemal reflektiert wird. Das Plättchen hat keinen Einfluß auf die spektrale Zusammensetzung des Lichtes. Durch die Bestimmung des Lampenspektrums am Reizort spielen Veränderungen des Xenon-Lampen-Spektrums z.B. durch die Optik des Systems keine Rolle.

Bestimmt man bei FIS nicht spektrale Empfindlichkeiten, sondern einfach reine Lampenspektren, so ist noch eine weitere Korrektur nötig, die oben angeführte $\Delta\lambda$ -Korrektur. Sie wird notwendig bei der Transformation der linearen Frequenzskala in die an sich nichtlineare Wellenlängenskala. Die Halbwertsbreiten der "Spektral-Bandpässe" der Fouriertransformation sind dann nicht mehr identisch, sondern sie sinken mit kleineren Wellenlängen. Dies entspricht der Situation beim Monochromator, wo in verschiedenen Spektralbereichen verschiedene Bandbreiten vorkommen. Diese unterschiedlichen Energiedichten haben hier ihre Ursache in der spektral unterschiedlichen Brechkraft.

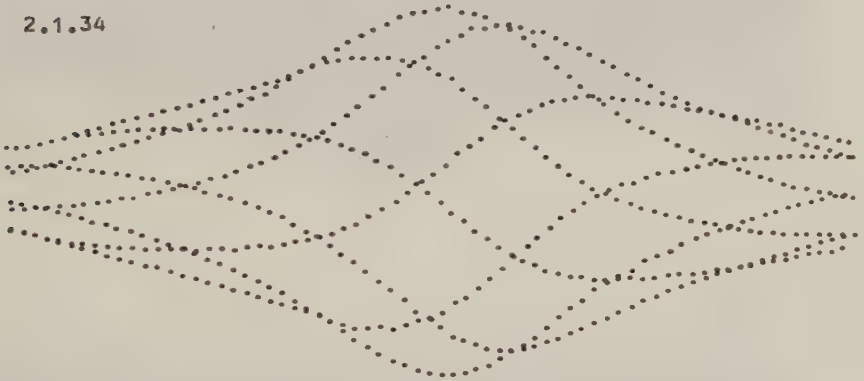
Die Abbildungen 2.1.34 bis 2.1.44 sind dem Thema Interferogrammform gewidmet: Die Interferogramme 2.1.34 bis 2.1.37 sind die Intensitätsmodulationen bei Verwendung von Licht, das durch ein Interferenzfilter ($\lambda_{\max} = 628 \text{ nm}$) geschickt wurde, bzw. bei Verwendung von Licht eines Helium-Neon-Lasers. Die Abbildungen 2.1.34 und 2.1.35 zeigen die wahren Meßpunkte, die Abbildungen 2.1.36 und 2.1.37 entstehen bei vektorieller Verbindung dieser Meßpunkte.

Es zeigt sich, daß die Interferogramme um so ausgeprägter ein Maximum aufweisen (Interferenzfilter 2.1.34 bzw. 2.1.36), je breiter das zugehörige Spektrum ist (siehe auch Kapitel 1.3).

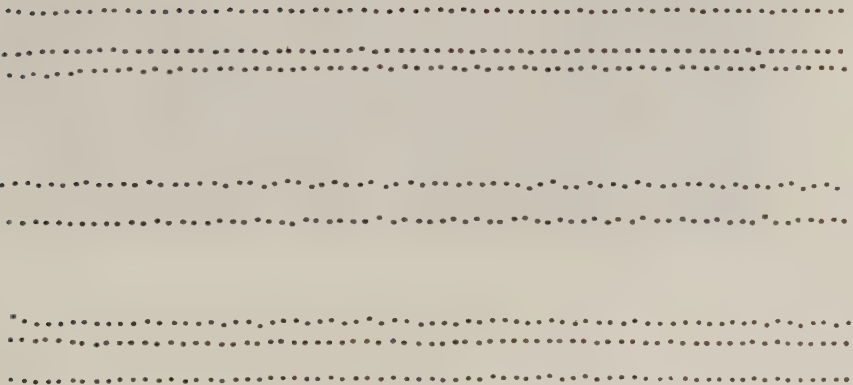
Die Abbildungen 2.1.38 und 2.1.39 zeigen Interferogramme einer Hg-Lampe (mit UV-Interferenzfilter) und eines Helium-Neon-Lasers. Ein Abschätzen des Spektralgehaltes ist durch

ein Auszählen der Modulationsperioden möglich. Dies liefert für die Hg-Lampe ca. 68, für den Laser 33 Perioden. Da der Laser die Wellenlänge 632,8 nm besitzt, folgt daraus, daß die Hauptkomponente der Hg-Lampe bei ca. 310 nm (exakt wäre 313 nm; Abbildung 2.1.7), also auf jeden Fall im UV zu suchen ist.

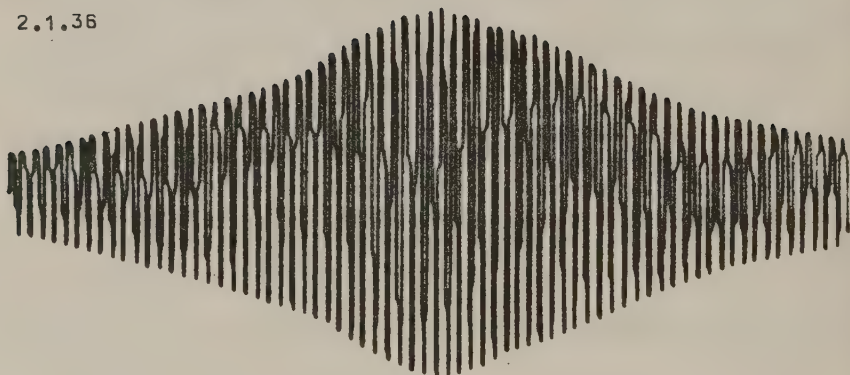
2.1.34



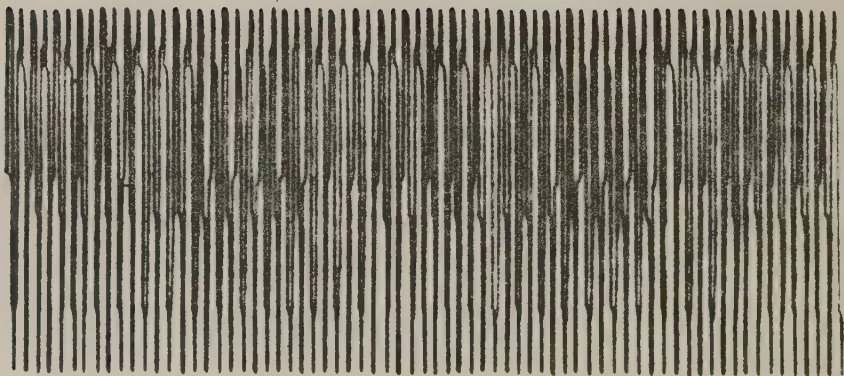
2.1.35



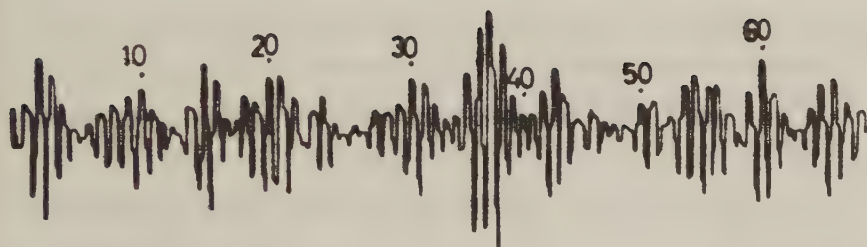
2.1.36



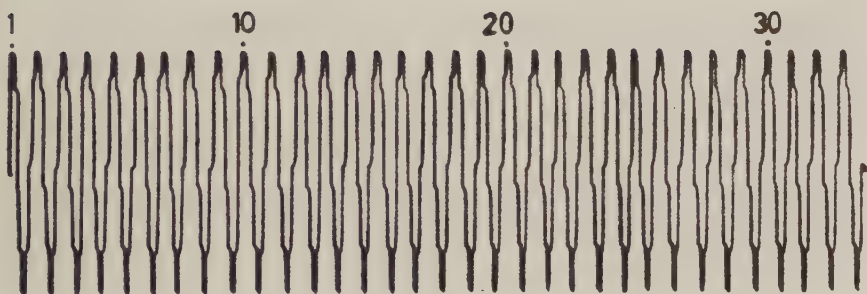
2.1.37



2.1.38



2.1.39



2.2 Bestimmung der spektralen Empfindlichkeit von Calliphora erythrocephala

Die Messung der spektralen Empfindlichkeit von Calliphora mit Hilfe der fourierinterferometrischen Stimulation wurde an normalen Wildtyp-Fliegen und an "Chalky" durchgeführt. Dieser Mutante fehlen die Ommochrome und Pteridine, die im sichtbaren Wellenlängenbereich und im UV die einzelnen Sehzellen bzw. Ommatidien optisch isolieren (Langer u. Patat 1961).

Zur Bestimmung der spektralen Empfindlichkeit wurden Summenantworten (ERG) und intrazellulär gemessene Antworten verwendet.

Die wichtigste Entdeckung, die bei den Experimenten gemacht werden konnte, betrifft die Struktur der spektralen Empfindlichkeit im ultravioletten Strahlungsbereich (Gemperlein, Paul, Lindauer, Steiner 1980).

Zur Verdeutlichung und Interpretation der Ergebnisse sollen im folgenden Reiz und Reaktion, die daraus erhaltenen "Rohspektren" und die Korrekturvorgänge gezeigt werden (Versuchsdaten: ERG, "Chalky", Vitamin-A-reich ernährt, vier Tage alt, Pässe: 0,1 Hz (Bp) - 17 Hz (Lp), ohne Hanning-Fenster, Einzellauf).

Die Abbildungen 2.2.1 und 2.2.2 zeigen die Interferogramme, wie sie vom Fotomultiplier bzw. aus der Retina der Fliege abgeleitet werden können. Der Ort der stärksten Modulation ist die sogenannte Weißlichtposition. Die hier gezeigten In-

terferogramme sind wegen ihres starken Modulationsabfalles typisch für breit ausgedehnte Spektren. Die Verzerrungen in der Ordinatenrichtung weisen auf Nichtlinearitäten hin. Die Antwort ist von leichtem Rauschen überlagert, das auf das reine Antwortspektrum zu liegen kommt (siehe die Abbildungen 2.1.22 bis 2.1.27 in Kapitel 2.1). Die absolute Stärke der Hauptmodulation beträgt bei ERG-Messungen von "Chalky" bis zu 10 mVolt. Größenordnungsmäßig sind die Antworten bei den anderen Ableitungen ähnlich (1 - 10 mV). Die Reizdauer beträgt je nach Methode (DAC, Regelung) eine bis dreißig Sekunden. Neunundvierzig Aufaddierungen waren im Normalfall die maximale Mittelungsrate.



2.2.1 Reiz (ungemittelt): Interferogramm einer Xenon-Lampe

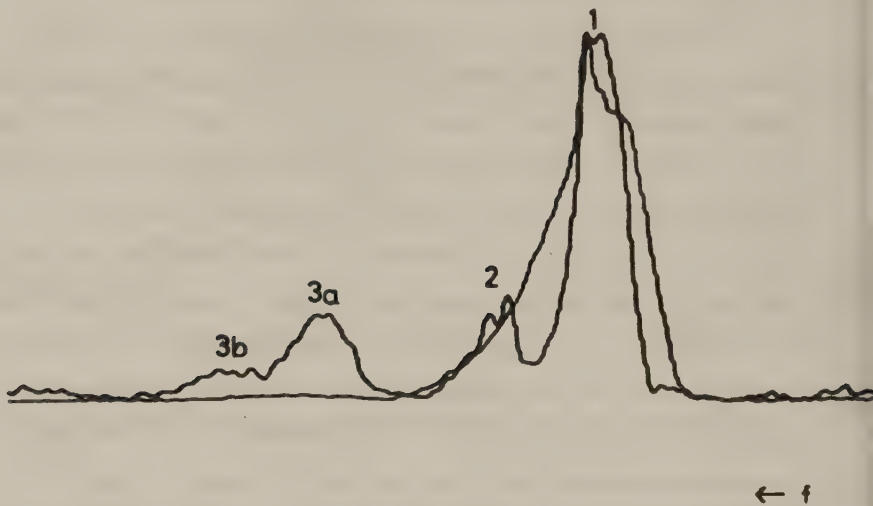


2.2.2 Antwort (ungemittelt): ERG der Mutante "Chalky"

Die Fourieranalyse der Interferogramme liefert die in Abbildung 2.2.3 gezeigten zwei "Rohspektren". Die niedrigen Frequenzen bzw. die großen Wellenlängen finden sich rechts. Das Lampenspektrum ist noch unkorrigiert. Die Reaktion der Fliege läßt sich in drei Teile aufteilen. Der erste, größte "Peak" (von rechts) stellt die Reaktion im sichtbaren Bereich dar (1). Daran schließt sich eine mindestens zweigipflige UV-Reaktion an (2). Der dritte "Peak" mit weiter links gelegenen Nebengipfel ist keine Reaktion im fernen UV, vielmehr handelt es sich um die durch die Nichtlinearität des Systems bedingten ersten harmonischen Schwingungen der Reaktionen im sichtbaren Bereich und im UV (3a u. 3b). Dies läßt sich aus den immer kleiner werdenden Reizstärken in diesen Bereichen folgern. Außerdem verschwinden partiell

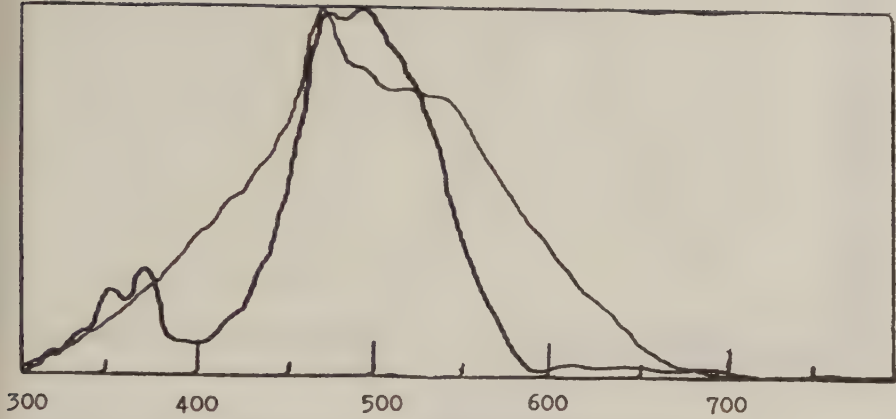
die Nichtlinearitäten bei der Auslöschung bestimmter Bereiche des Spektrums durch geeignete Farbfilter.

Die Reiz- und so auch die Reaktionsstärke ist im UV geringer als im Sichtbaren. Rauschen, das auf das Interferogramm gelangt, lagert sich in etwa gleichmäßig, wie nachgeprüft wurde, auf das Spektrum. Im UV-Bereich des Antwortspektrums ist also das Signal-Rausch-Verhältnis schlechter als im sichtbaren Bereich. Dies führt zu einer stärkeren Variabilität im UV. Um dies zu vermeiden, gibt es zwei Möglichkeiten. Erstens kann durch geschickte Filterung und Überlagerung von Lichtern ein für den ganzen Spektralbereich einigermaßen quantengleiches Reizspektrum erzeugt werden, um so das Signal-Rausch-Verhältnis im UV an das im Sichtbaren anzunähern. Zweitens kann ein Weg gewählt werden, der bei vielen hier dargestellten Versuchen begangen wurde, nämlich die Betonung des UV-Bereichs durch entsprechende breitbandige UV-Durchlaßfilter. Die Empfindlichkeit der Sehzellen wird vom lichtschwächeren UV-Licht statt vom sichtbaren Bereich bestimmt und sie erhöht sich so entsprechend. Weiterhin läßt sich durch eine Erhöhung der Verstärkung die Aussteuerung der UV-Reaktion wesentlich verbessern. Zudem läßt sich die Filterung noch optimieren.

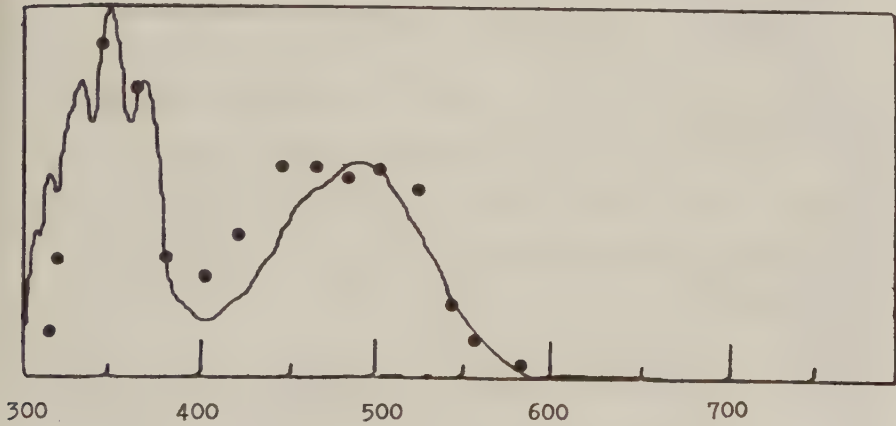


2.2.3 Unkorrigierte Spektren

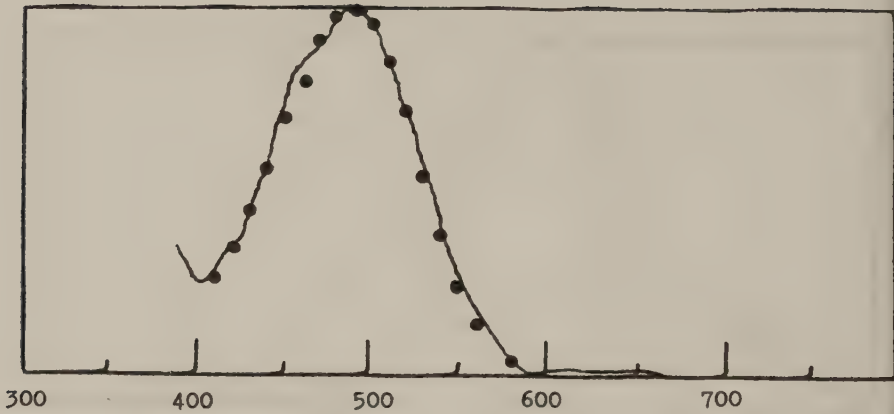
Die Abbildung 2.2.4 zeigt die unkorrigierten Spektren nach der Frequenz-Wellenlängen-Transformation der Abszisse. Die Division des Antwortspektrums durch die Lampe nach den in Kapitel 2.1 gezeigten Korrekturen liefert die spektrale Empfindlichkeit (Abbildung 2.2.5). Das untersuchte Tier war mit Vitamin-A-reicher Kost gefüttert worden und hatte einen sehr hohen UV-Gipfel. Zur Verdeutlichung der Struktur im sichtbaren Bereich wurde diese separat skaliert (Abbildung 2.2.6). Die eingezeichneten schwarzen Punkte wurden einem Dartnall-Nomogramm entnommen (Dartnall 1953). Sie zeigen die Absorptionskurve eines Rhodopsins mit $\lambda_{\max} = 490 \text{ nm}$.



2.2.4 Wellenlängenplot der unkorrigierten Spektren

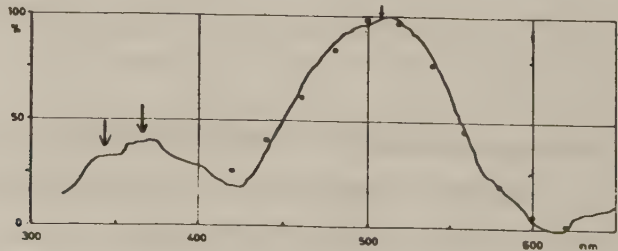


2.2.5 Spektrale Empfindlichkeit (schwarze Punkte: Messung der spektralen Empfindlichkeit nach Kuo 1979)



2.2.6 FIS-Messung der spektralen Empfindlichkeit im Sichtbaren im Vergleich zur Rhodopsin-Absorptionskurve

Eine derartig gute Übereinstimmung der spektralen Empfindlichkeit von *Calliphora* im Sichtbaren mit der theoretischen Rhodopsinkurve findet sich nach Wissen des Verfassers nur bei mikrospektralfotometrischen Messungen von Langer (Langer u. Thorell 1966).



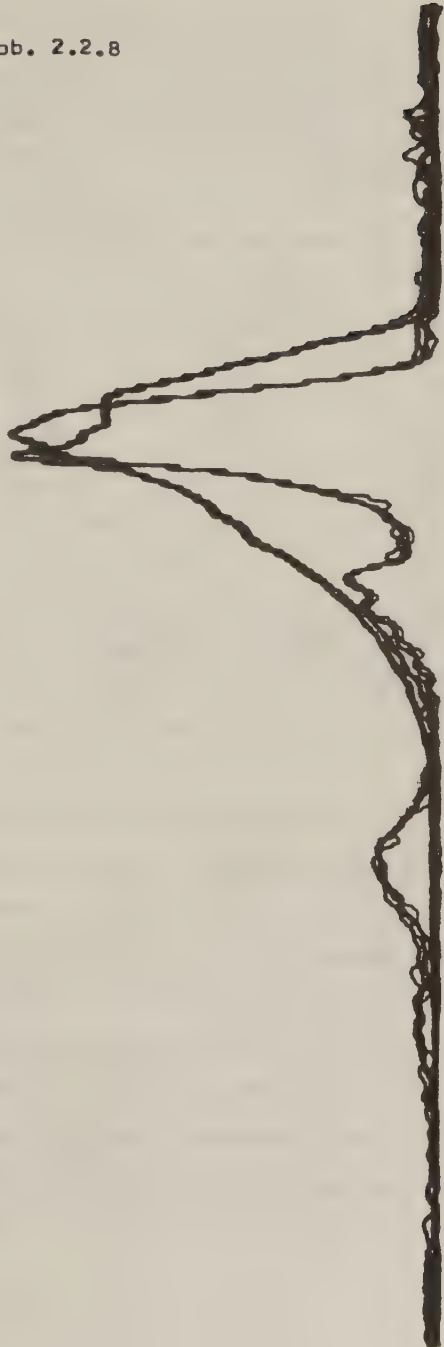
2.2.7 Extinktionsmessung eines Rezeptors R6 (aus Langer 1972)

Zur Prüfung der Qualität unseres Verfahrens wurde eine Reihe von zeitlich aufeinander folgenden Messungen der spektralen Empfindlichkeit durchgeführt:

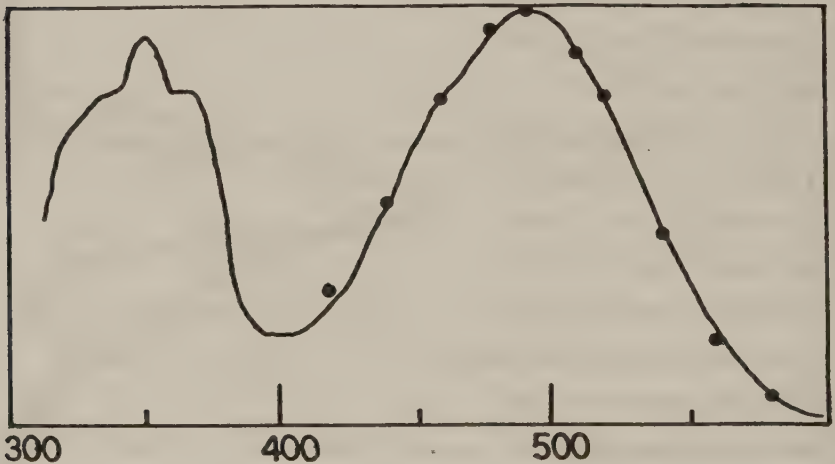
Die Abbildung 2.2.8 zeigt im Minutenabstand gemessene unkorrigierte Lampen- und Antwortspektren. Das Versuchstier war sieben Tage alt, und die Datensätze wurden mit einem Hanning-Fenster bewertet. Die restlichen Versuchsdaten entsprechen denen des oben angegebenen Experiments.

Man sieht, daß die auf Seite 110 angegebenen Grundstrukturen bei jedem Lauf auftreten. Das auf den Spektren aufliegende leichte Rauschen läßt sich durch Mittelung stark reduzieren.

Abb. 2.2.8



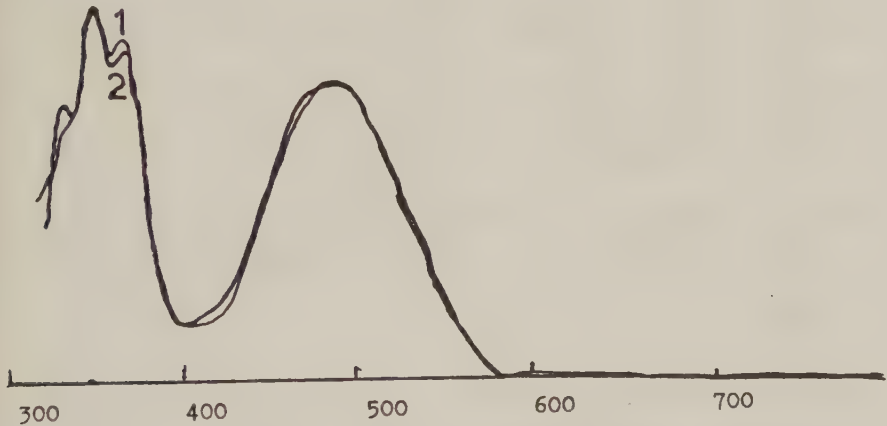
Das Resultat der Mittelung von fünf Einzelläufen zeigt die Abbildung 2.2.9, die eine exzellente Übereinstimmung der spektralen Empfindlichkeit mit der theoretischen Rhodopsinkurve aufweist.



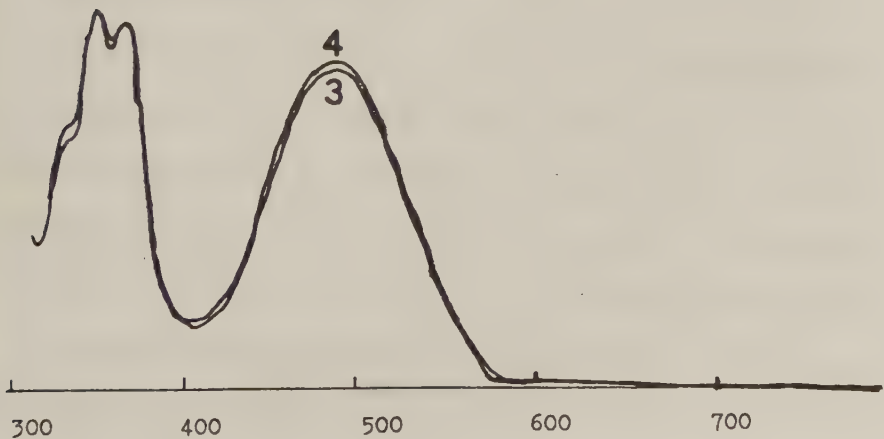
2.2.9 Spektrale Empfindlichkeit aus fünf Einzelläufen

Bei einer weiteren Meßreihe wurden im Abstand von jeweils zehn Minuten spektrale Empfindlichkeiten bestimmt (Versuchsdaten: "Chalky⁺" (also Vitamin-A-reich ernährt), zwölf Tage alt, ERG, Fahrweg: 34 Å, mit Hanning-Fenster, Einzelläufe). Hier zeigte sich, daß im Laufe des Experiments gewisse Veränderungen der spektralen Empfindlichkeit stattfinden, die im wesentlichen die Relation des Sichtbaren zum UV betreffen. Die Empfindlichkeiten ließen sich zeitlich immer in Zweiergruppen ähnlicher Empfindlichkeit zusammenfassen. Als wahrscheinlichste Ursache

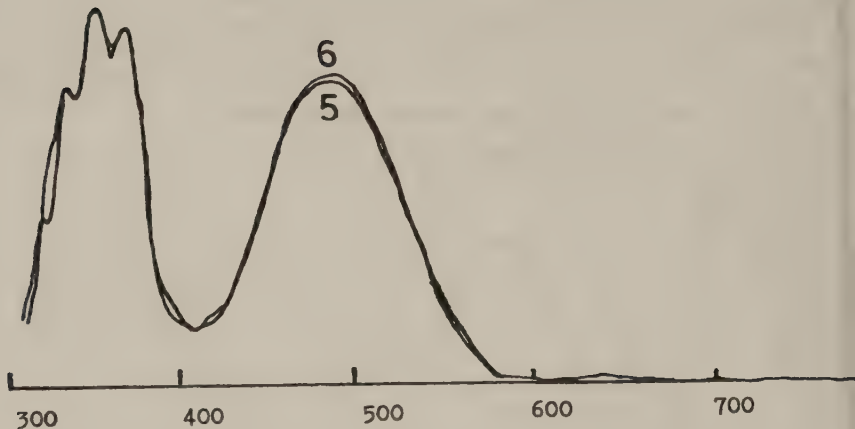
für diese Verschiebungen werden Veränderungen des Frequenz-
ganges angenommen, der aber bei diesen Versuchen noch nicht laufend
kontrolliert werden konnte. Die Grundform der spektralen Emp-
findlichkeit ist aber über die Zeit konstant. Die Abbildungen
2.2.10 bis 2.2.12 zeigen dieses Experiment.



2.2.10



2.2.11



2.2.12

Vor einer Diskussion der UV-Struktur sollen noch einige Anmerkungen zu dem bisher Besprochenen gemacht werden. Zum einen muß gesagt werden, daß eine derartig gute Übereinstimmung der spektralen Empfindlichkeit mit der Rhodopsinkurve momentan nur mit der sehr linearen DAC-Methode gewonnen werden kann. Bei Messungen mit der Regelung sind leichte Abweichungen im Blau-Bereich vorhanden, deren Ursachen noch nicht geklärt sind. Weiter sind diese Übereinstimmungen nur mit der Mutante "Chal-ky" erzielbar. Beim Normaltyp beeinflussen die Abschirmpigmente selbst bei eindeutig intrazellulärer Ableitung die Gestalt der Reaktionskurven.

Zu beantworten bleibt noch die Frage, warum die spektrale Empfindlichkeit, wie sie aus dem ERG bestimmt werden kann, mit

der theoretischen Rhodopsinkurve übereinstimmt: Die ERG-Antwort auf Rechteckreizung hin setzt sich aus Komponenten zusammen, die der Retina entstammen, und aus Teilen, deren Ursprung in den optischen Ganglien zu suchen ist (Autrum, Autrum u. Hoffmann 1961). Aus den verarbeitenden Zentren stammt unter anderem der positive Ein-Effekt. In der Retina entsteht das negative Zwischenpotential (extrazellulär gemessene Depolarisierung der Sehzellen!). Weiter unten dargestellte Experimente zeigen, daß intrazelluläre Ableitungen des Rezeptortyps R1-6 und ERG-Untersuchungen bei "Chalky" ähnliche Ergebnisse liefern. Dies wurde auch schon früher nachgewiesen (Hoffmann, Langer 1961).

Die Ursache für diese Übereinstimmung ist zum einen die Dominanz des Rezeptortyps R1-6 in der Retina-Antwort gegenüber den übrigen Rezeptortypen. Pro Ommatidium befinden sich sechs Rezeptoren R1-6 und zwei Rezeptoren R7 und R8, die sich überdies noch in ihrer spektralen Empfindlichkeit unterscheiden. Zum anderen ist der Beitrag der verarbeitenden Zentren zur Interferogrammantwort als sehr gering zu veranschlagen. Die mehr phasischen Komponenten aus den optischen Ganglien folgen sicher nicht nur einfach der Retina-Antwort. Als Resultat eines Wechselspiels von Aktivierung und Hemmung ist ein sehr komplexes Signalmuster zu erwarten, dessen Gesamtamplitude klein sein wird und dessen Form rauschähnliche Züge tragen wird. Rein negative ERG-Antworten auf Rechteckreizung sind gelegentlich festzustellen, vor allem gegen Ende eines längeren Experiments. FIS-Messungen bei dieser Potentialform führen, wie unten gezeigt, zu denselben Resultaten wie bei der norma-

len ERG-Form. Dies bestätigt die obigen Ausführungen, da bei rein negativen ERG-Antworten wahrscheinlich die optischen Ganglien geschädigt sind (Autrum, Autrum u. Hoffmann 1961).

Die ERG-Antwort spiegelt also im wesentlichen die Reaktionen des Rezeptortyps R1-6 wieder, und dessen Sehfärbstoff ist ein Rhodopsin mit einer maximalen Empfindlichkeit bei einer Wellenlänge um 493 nm.

Als intrazellulär galten die in diesem Abschnitt erwähnten Ableitungen, wenn folgende Kriterien erfüllt waren: Potentialsprung von beträchtlicher Größe (30 bis 60 mVolt), Stabilität des Ruhepotentials (Abweichungen bis zu 10 mVolt wurden toleriert) und als wichtigstes Kriterium: monophasische depolarisierende Rechteckantworten. Die Potentialhöhen auf Rechteckreizung betrugen maximal 40 mVolt bei intrazellulärer Antwort und ca. 15 - 20 mVolt bei ERG-Antwort. Da die Ausleuchtung momentan nicht ideal ist (Parallellicht aus einem ca. 30 cm vom Objekt entfernten Lichtleiter, Lichtverluste vor und im Lichtleiter) ist diese Angabe nicht von größerer Bedeutung. Bei höheren Lichtstärken ließen sich sicher größere Depolarisationen messen.

Nun zum Kernpunkt dieser Arbeit:

Die spektrale Empfindlichkeit von *Calliphora erythrocephala* zeigt im UV eine Feinstruktur.

Die Erörterung dieses Themas beginnt mit der Betrachtung der Reiz- und Antwortinterferogramme. Die Abbildungen 2.2.13 bis 2.2.16 zeigen zugehörige Reiz-Antwort-Paare. Das Reizinterferogramm ist typisch für ein breitbandiges Spektrum (rascher Modulationsabfall). Die Antwortinterferogramme zeigen ausgeprägte Seitenbanden, die typisch für Spektren mit mindestens zwei Komponenten sind (schwebungsähnliche Struktur). Das Reizlicht wurde durch ein Filter (UG 11) auf ultraviolettes Licht beschränkt. Die Form des Antwortinterferogramms zeigt also schon, daß die Empfindlichkeit der Fliege im Ultravioletten eine mindestens zweigipflige Form besitzt.

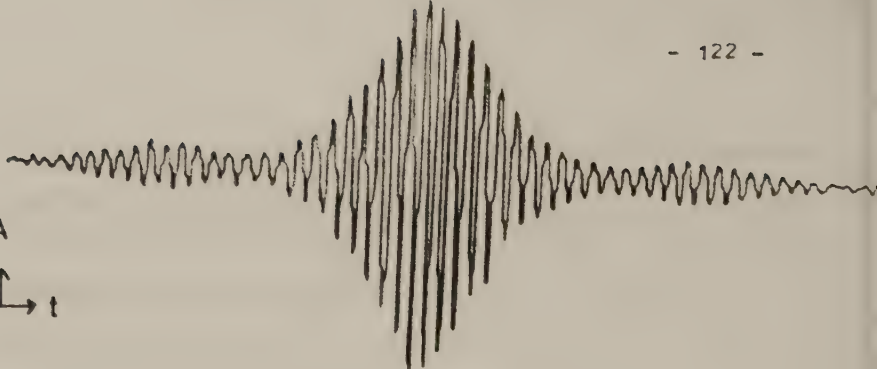
Dieses und die folgenden Experimente wurden an "Chalky" gemacht. Es handelt sich um Einzelläufe und ERG-Untersuchungen. Man beachte die Reproduzierbarkeit der Interferogramme. Die zugehörigen Spektren finden sich in der Abbildung 2.2.41 .



2.2.13 Reizinterferogramm

A

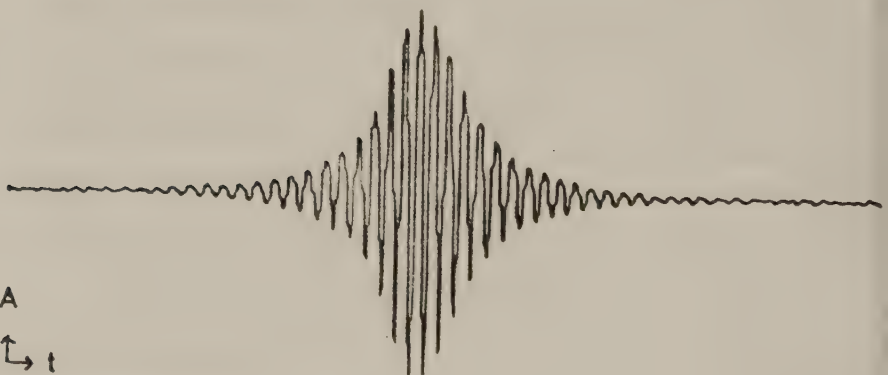
↑
→ t



2.2.14 Reaktion auf 2.2.13

A

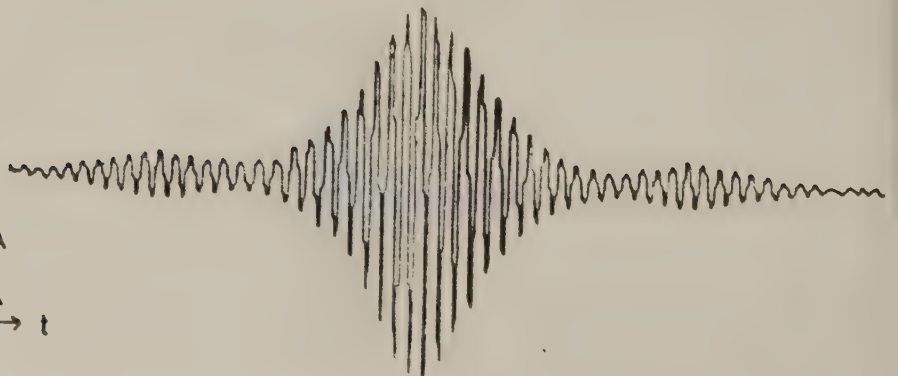
↑
→ t



2.2.15 Reizinterferogramm

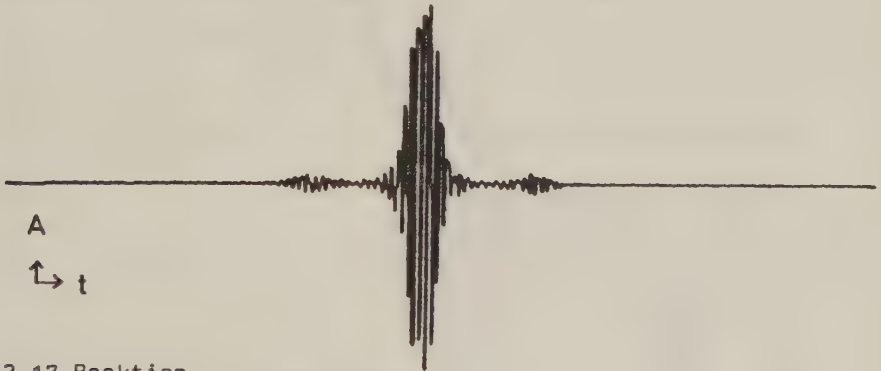
A

↑
→ t



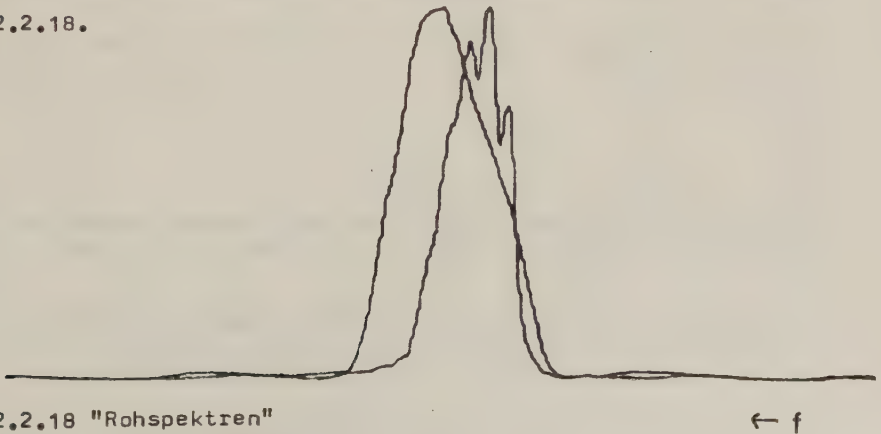
2.2.16 Reaktion auf 2.2.15

Die Abbildung 2.2.17 zeigt die Antwort auf ein Reizinterferogramm, das ebenfalls durch ein Filter (Baird Atomic, Interferenzfilter $\lambda_{\max} = 265 \text{ nm}$) auf das UV beschränkt wurde. Dieses Experiment wurde mit der Regelung durchgeführt. Der optische Weg betrug hier 72λ . Bei den Einzelläufen war er 32λ . Die Mittelungsrate ist hier hoch, um das Ergebnis sehr rauscharm zu machen ($M = 100$). Die sonstigen Daten: "Chalky", ERG, Vitamin A⁺, neun Tage alt, Pässe zwischen 7,5 Hz und 12 Hz, Berechnung ohne Hanning-Fenster.

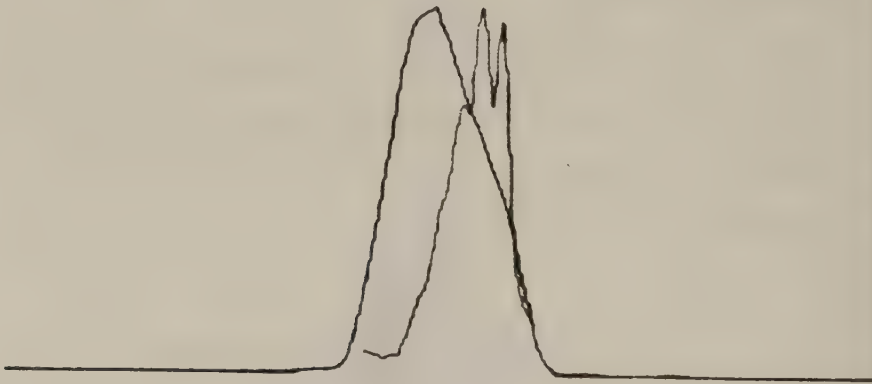


2.2.17 Reaktion

Die unkorrigierten Reiz- und Antwortspektren zeigt Abbildung 2.2.18.

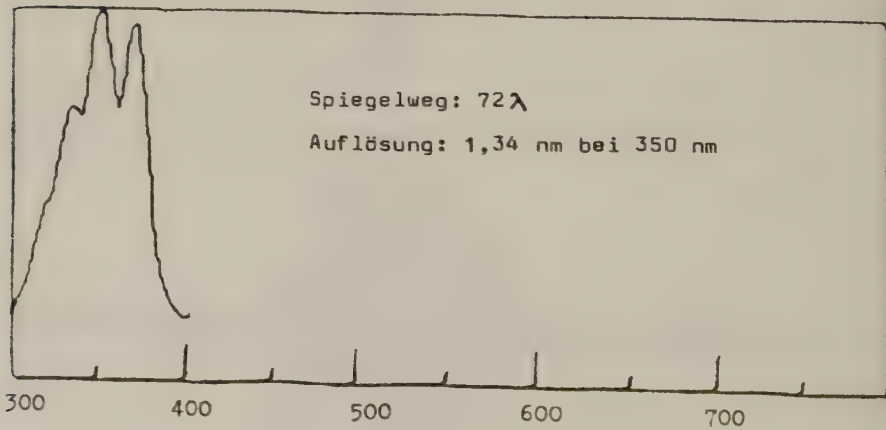


Die Korrekturen und die Division führen zu den Spektren in Abbildung 2.2.19. Die spektrale Empfindlichkeit zeigt Abbildung 2.2.20.



2.2.19 Korrigierte Spektren

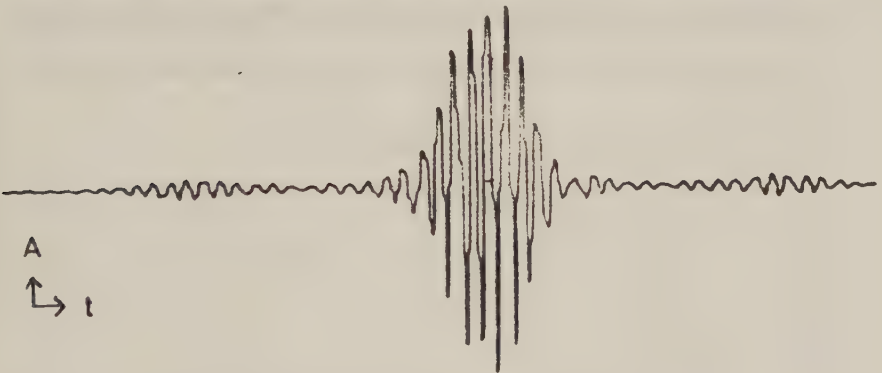
← f



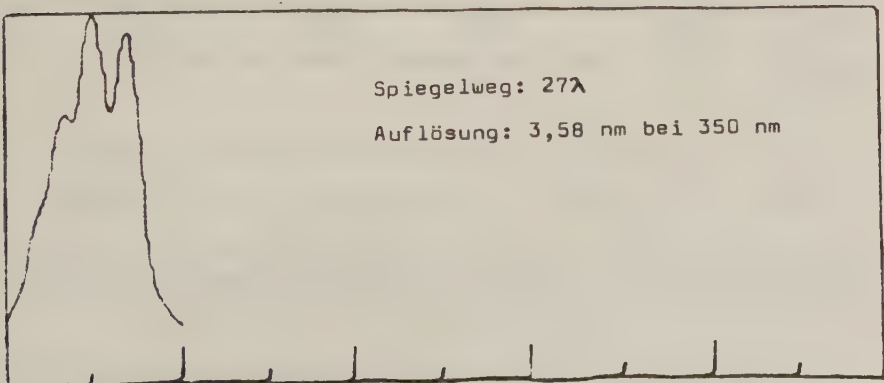
2.2.20 Die spektrale Empfindlichkeit von *Calliphora erythrocephala* im Bereich zwischen 300 und 400 nm.

Die folgenden Ausführungen beantworten die Frage, wie sich die UV-Feinstruktur bei verschiedener Auflösung darstellt.

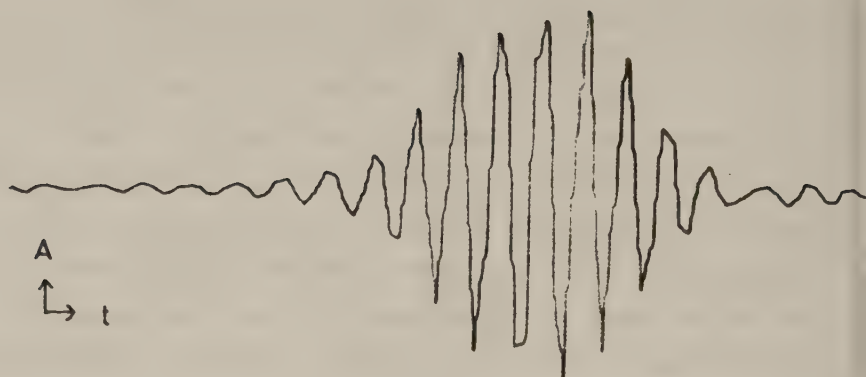
Dazu wird mit Hilfe eines Programms die Länge eines Interferogramms künstlich verändert. Damit verändert sich, wie in Kapitel 1.3 gezeigt, auch die Auflösung. Die Abbildung 2.2.21 zeigt das knapp hinter den Seitenbändern geschnittene Interferogramm 2.2.17. Die zugehörige spektrale Empfindlichkeit ist in der Abbildung 2.2.22 dargestellt. Eine Reduzierung des Interferogramms auf den "inneren Kern" führt zum Interferogramm 2.2.23 mit der zugehörigen Empfindlichkeit in Abbildung 2.2.24.



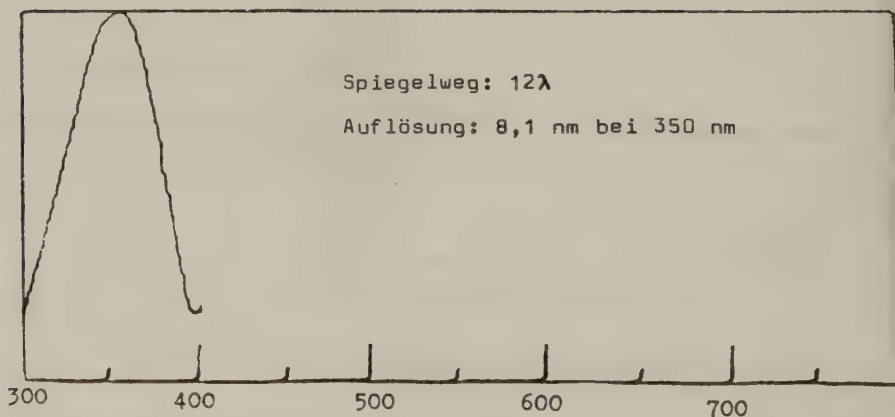
2.2.21 Gekürztes Interferogramm der Abbildung 2.2.17



2.2.22 Zu 2.2.21 gehörige spektrale Empfindlichkeit



2.2.23 Stark gekürztes Interferogramm der Abbildung 2.2.17

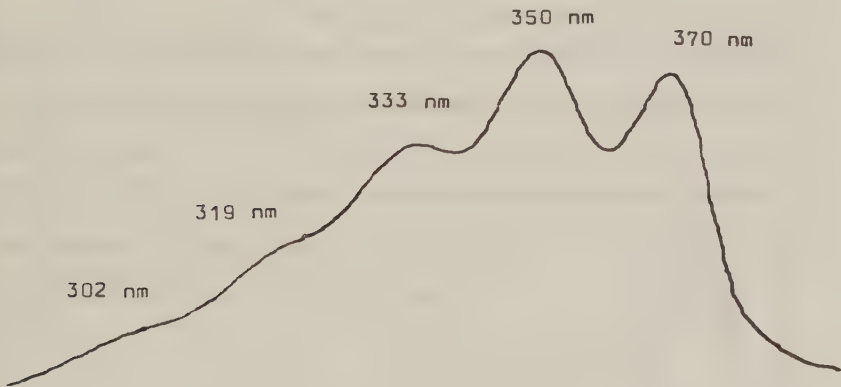


2.2.24 Zu 2.2.23 gehörige spektrale Empfindlichkeit

Die obigen Ausführungen demonstrieren einen der großen Vorteile von FIS, nämlich den Vorteil einer hohen Auflösung. Die erste Verkürzung des Interferogramms bzw. die Verminderung der Auflösung brachte keine neue spektrale Empfind-

lichkeit. Das heißt, daß die gemessene Feinstruktur sich ab einer bestimmten Auflösung nicht weiter aufspaltet. Die zweite Verkürzung bzw. Verminderung der Auflösung führt zum Verschwinden der Feinstruktur, und nur die Grundgestalt bleibt erhalten. Eine Feinstruktur im UV läßt sich also nur messen mit einem Gerät, das im Spektralbereich eine bestimmte Mindestauflösung bietet. Dies ist bei der Verwendung von Interferenzfiltern nicht gegeben.

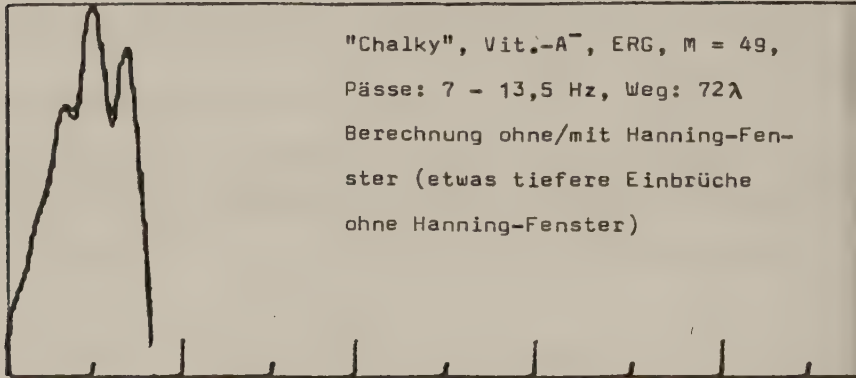
Die Abbildung 2.2.25 zeigt die spektrale Empfindlichkeit der Abbildung 2.2.20 gespreizt, zusammen mit der Angabe der Lage der einzelnen Maxima. Die Wellenlängen-Skala wurde hier nicht linearisiert.



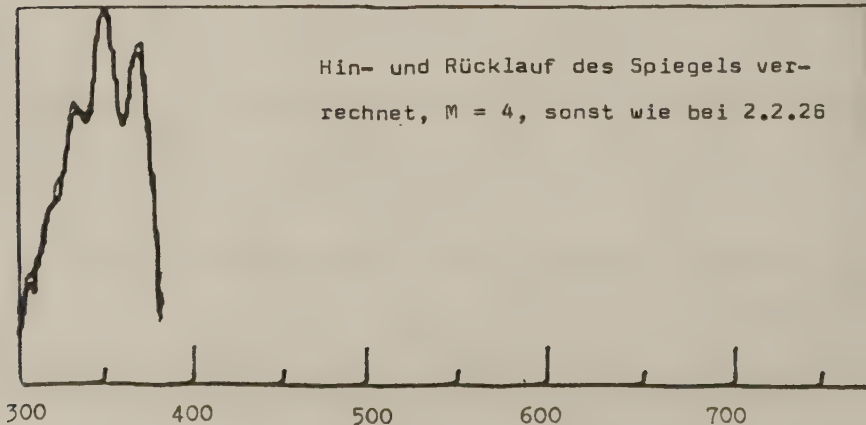
2.2.25 Spektrale Empfindlichkeit von *Calliphora erythrocephala* ("Chalky", ERG) zwischen 289 und 401 nm

Die Struktur im UV war immer zu beobachten und war bezüglich der Lage der Maxima vollkommen stabil. Eine Reihe weiterer Messungen belegt dies.

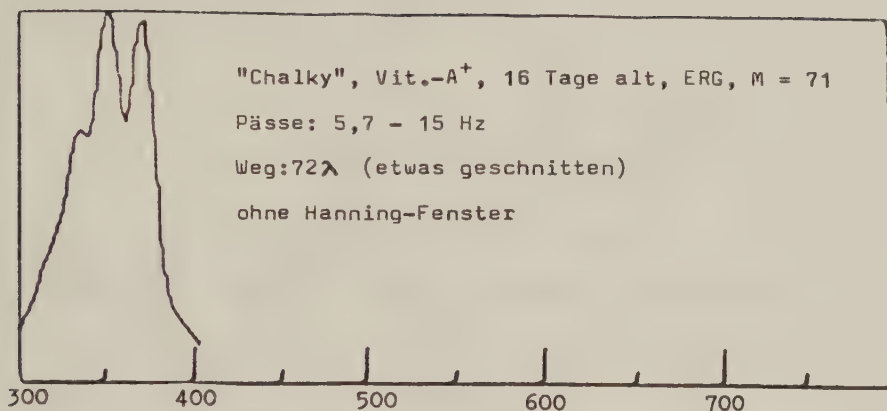
Experimente mit hoher Auflösung und hoher Mittelungsrate zeigen die Abbildungen 2.2.26 bis 2.2.28. Die Versuchsdaten stehen bei den Abbildungen.



2.2.26 Spektrale Empfindlichkeit (Filter: UG 11(3 mm))

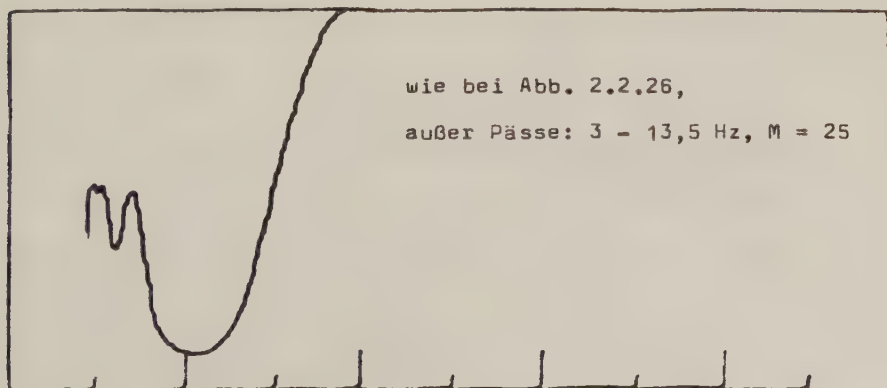


2.2.27 Spektrale Empfindlichkeit (Filter: UG 11 (3mm))

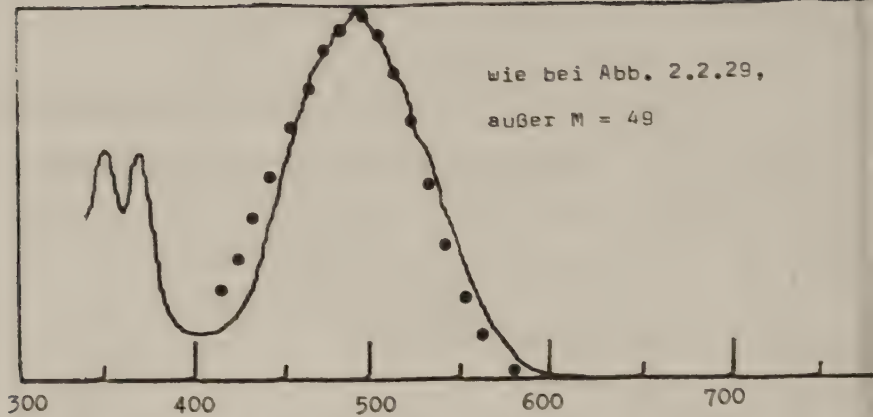


2.2.28 Spektrale Empfindlichkeit (Filter: Baird Atomic 265 nm)

Zur Prüfung der Frage nach dem langwelligsten Maximum, welches ein Kriterium für die der Empfindlichkeit zugrundeliegende Stoffart ist, wurden Experimente mit Blau- und Violettfiltern durchgeführt. Die Ergebnisse werden auf den Abbildungen 2.2.29 und 2.2.30 gezeigt. Das langwelligste Maximum findet sich bei 370 nm.



2.2.29 Spektrale Empfindlichkeit (Filter: BG 12)

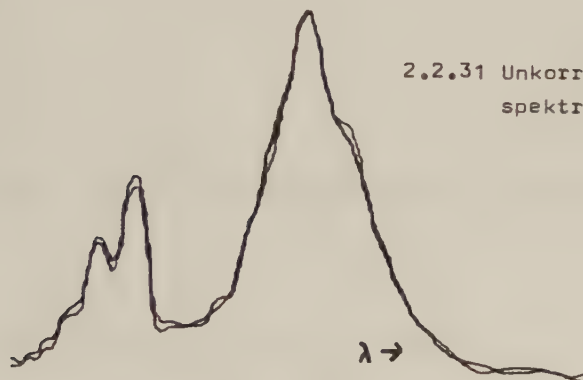


2.2.30 Spektrale Empfindlichkeit (Filter: UG 3₁)

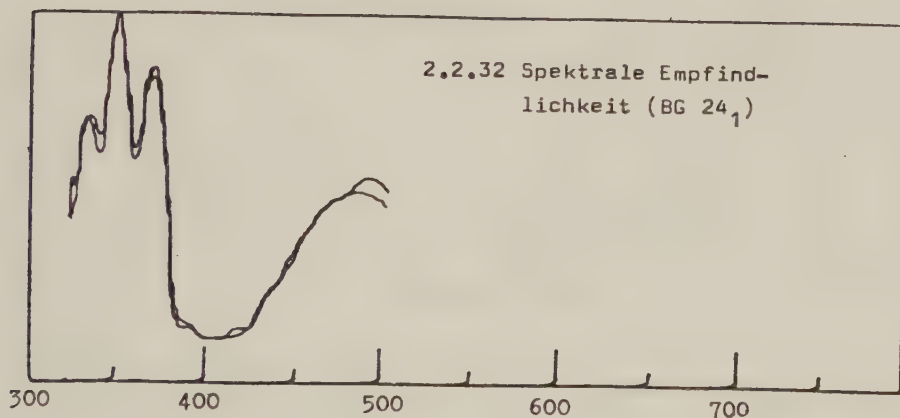
Die Empfindlichkeit 2.2.30 zeigt auch wieder eine recht gute Übereinstimmung mit der Rhodopsinkurve. Die Abweichungen im langwelligen Bereich sind hier wahrscheinlich filterbedingt. Die Abweichungen im kurzwelligen Bereich treten bei Messungen mit der Regelung auf.

Die Abbildungen 2.2.31 bis 2.2.41 zeigen Einzelmessungen mit verschiedenen UV-Durchlaßfiltern. Die Darstellung der Messungen mit den einzelnen Filtern gliedert sich in zwei Gruppen, wobei zuerst unkorrigierte Spektren zweier Einzelläufe gezeigt werden und dann die zugehörigen spektralen Empfindlichkeiten. Die Reihenfolge der Messungen mit Farbgläsern der Fa. Schott ist folgende: BG 24 (1mm), BG 24 (2 mm), BG 24 (4mm), UG 5 (1 mm), UG 5 (3 mm) und UG 11 (3 mm). Es handelt sich um ERG-Untersuchungen an "Chalky". Sonstige Daten: Vitamin-A⁺, vier Tage alt, M = 1; Pässe: 0,1 Hz bis 17 Hz; Weg: 32λ, ohne Hanning-Fenster. Das Tier wurde

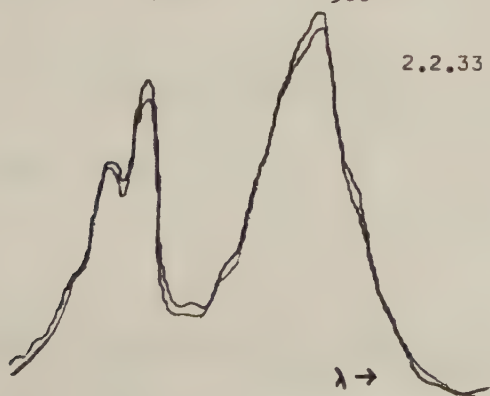
jeweils drei Minuten an das jeweilige Filter adaptiert. Beachtenswert ist neben der immer vorhandenen Mehrgipfligkeit die Reproduzierbarkeit.



2.2.31 Unkorrigiertes Antwortspektrum (BG 24₁)

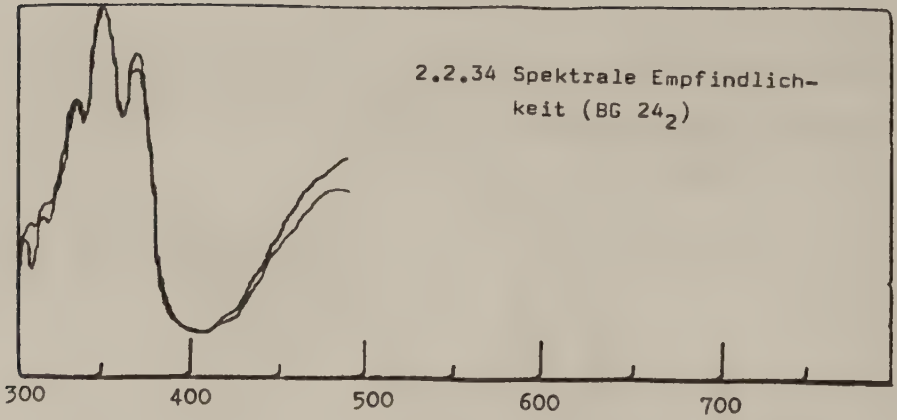


2.2.32 Spektrale Empfindlichkeit (BG 24₁)

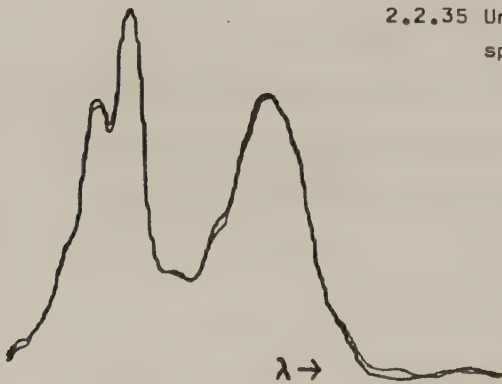


2.2.33 Unkorrigiertes Antwortspektrum (BG 24₂)

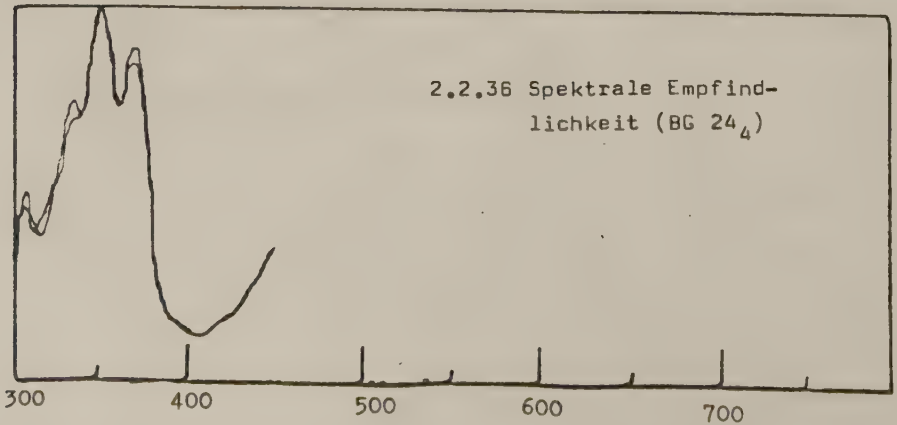
2.2.34 Spektrale Empfindlichkeit (BG 24₂)

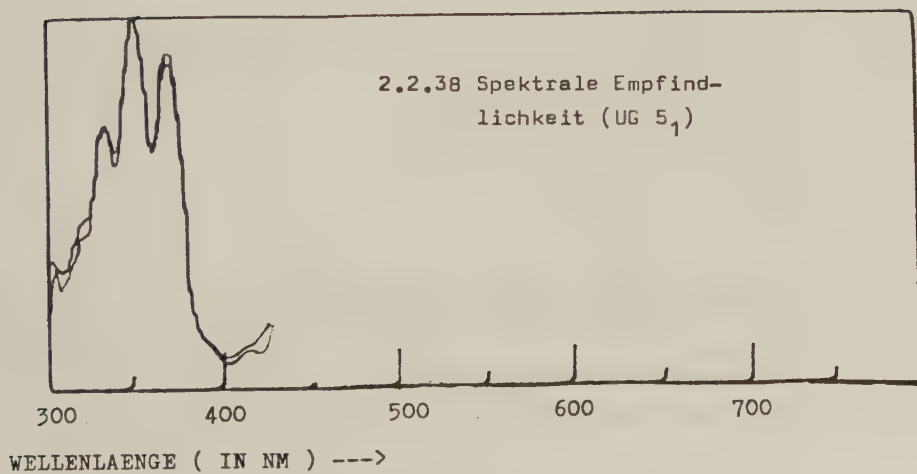


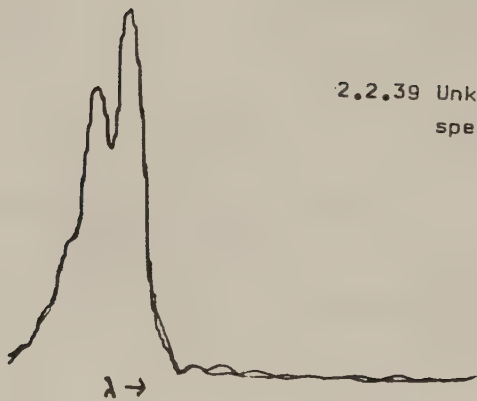
2.2.35 Unkorrigiertes Antwortspektrum (BG 24₄)



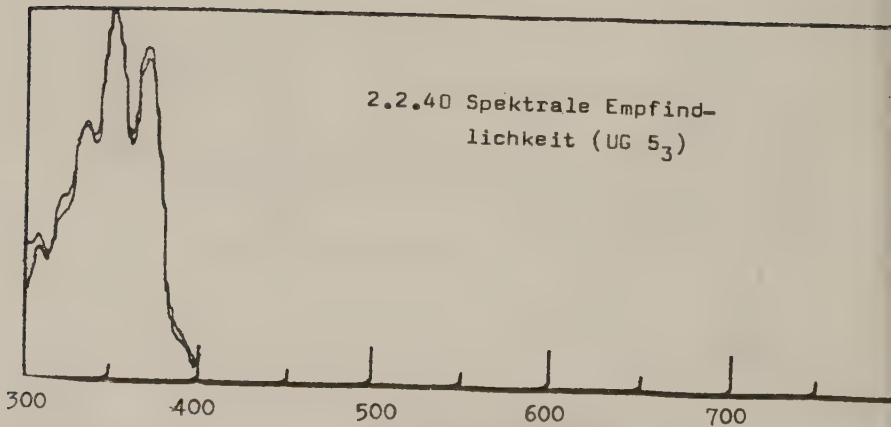
2.2.36 Spektrale Empfindlichkeit (BG 24₄)







2.2.39 Unkorrigiertes Antwort-
spektrum (UG 5₃)

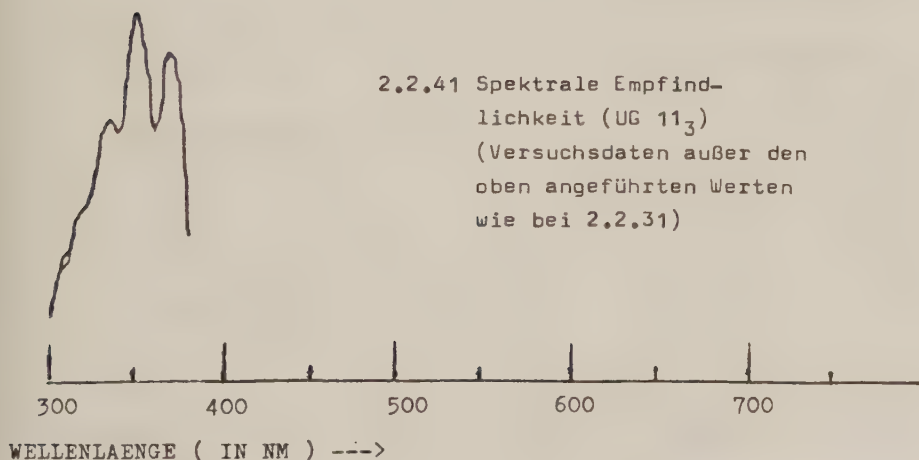


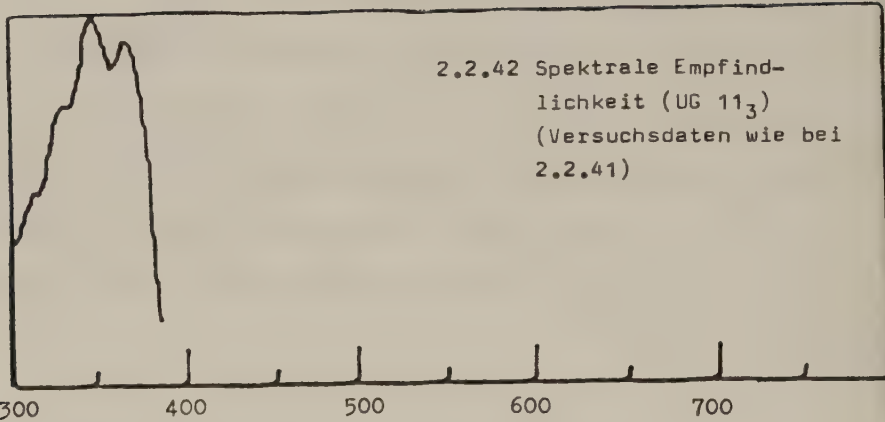
2.2.40 Spektrale Empfind-
lichkeit (UG 5₃)

Die spektrale Empfindlichkeit der Abbildung 2.2.41 wurde an einem Vitamin-A⁻-Tier gemessen. Die Pässe standen zwischen 1 und 10 Hz.

Die Messung 2.2.42 ist ebenfalls eine "Chalky"-Messung.

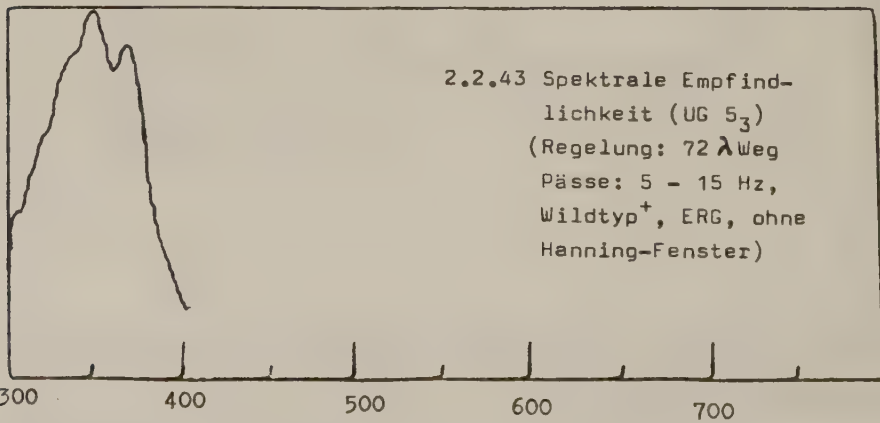
Es fällt die geringere Einbruchstiefe zwischen den Gipfeln auf. Ähnliches findet sich häufiger bei Wildtyp-Messungen, wobei die Ursache dafür nicht ganz klar ist. Einer der Gründe könnte ein schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis (weniger Streulicht) sein, das die Auflösung vermindert. Vielleicht verschleift der Pupillenmechanismus (Kirschfeld u. Franceschini 1968) aber auch die Interferogramme. Die Lage der Hauptgipfel ist hingegen stabil. Eine gemittelte Wildtyp-ERG-Antwort, die Ähnlichkeit mit 2.2.42 zeigt, wird in der Abbildung 2.2.43 dargestellt.





2.2.42 Spektrale Empfind-
lichkeit (UG 11₃)
(Versuchsdaten wie bei
2.2.41)

WELLENLAENGE (IN NM) --->



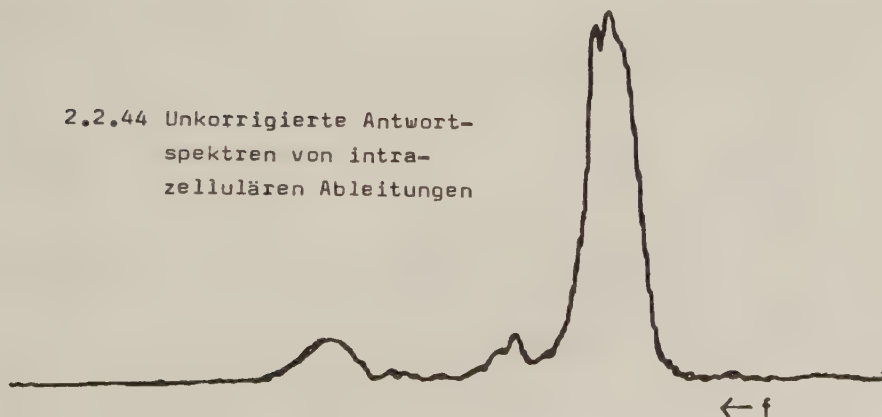
2.2.43 Spektrale Empfind-
lichkeit (UG 5₃)
(Regelung: 72 λ Weg
Pässe: 5 - 15 Hz,
Wildtyp⁺, ERG, ohne
Hanning-Fenster)

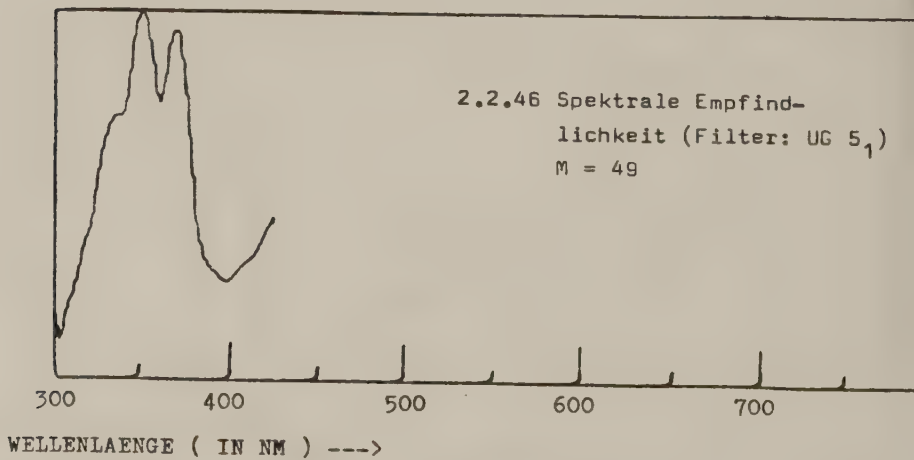
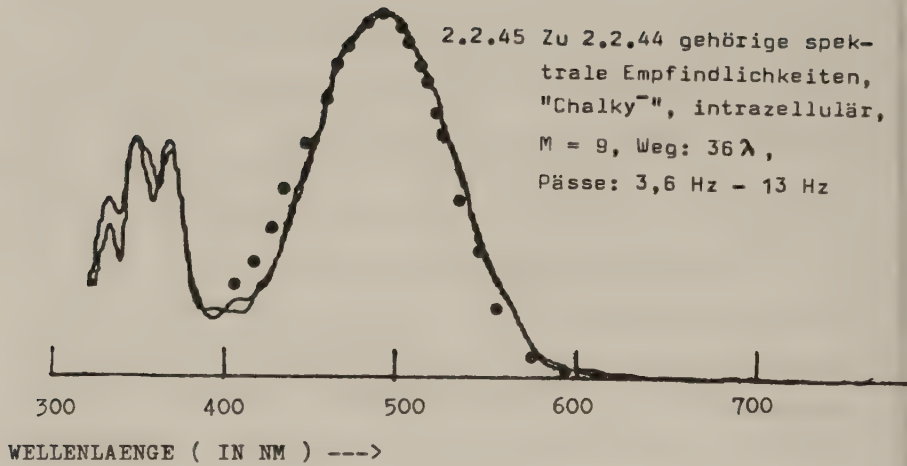
WELLENLAENGE (IN NM) --->

Die nun folgenden Abbildungen zeigen intrazelluläre Messungen bei "Chalky" und Wildtyp:

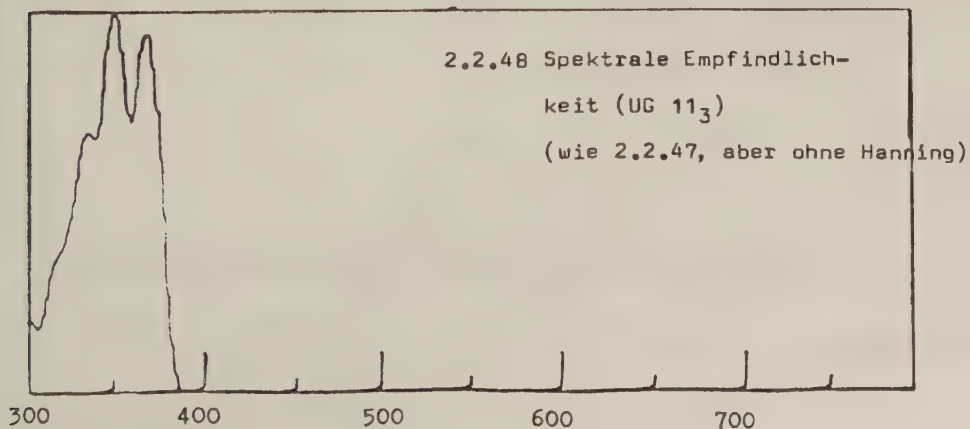
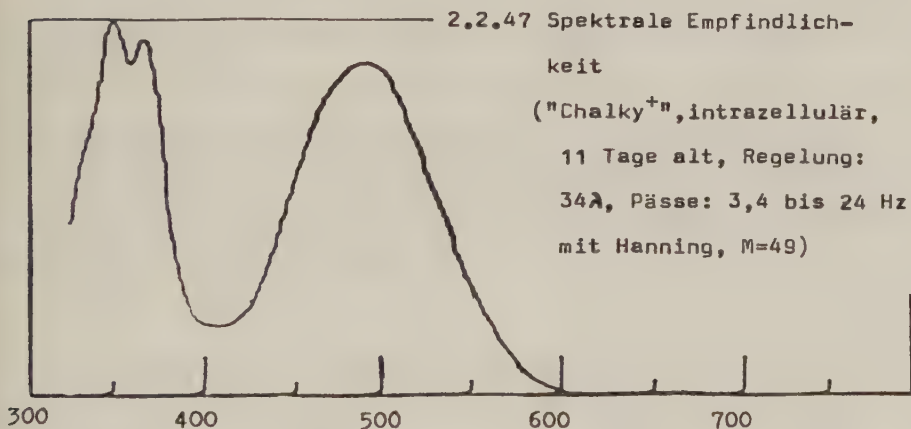
Die Ergebnisse bei "Chalky" decken sich voll mit den ERG-Untersuchungen. Die Abbildungen 2.2.44 und 2.2.45 zeigen unkorrigierte Spektren und die daraus errechneten Empfindlichkeiten von intrazellulären Ableitungen bei "Chalky". Es handelt sich um Messungen, die etwa zehn Minuten auseinander lagen. Die Stabilität der Ableitung wurde laufend überwacht (Ruhepotential, rein depolarisierende Rechteckantwort u.a.). Die Abbildung 2.2.46 zeigt die an derselben Zelle gemessene spektrale Empfindlichkeit im UV. Der in Abbildung 2.2.44 im Sichtbaren vorhandene Einbruch entsteht durch die spektrale Struktur der Xenon-Lampe. Nach der Division durch dieses Spektrum ist er vollkommen verschwunden (Abbildung 2.2.45).

2.2.44 Unkorrigierte Antwort-
spektren von intra-
zellulären Ableitungen

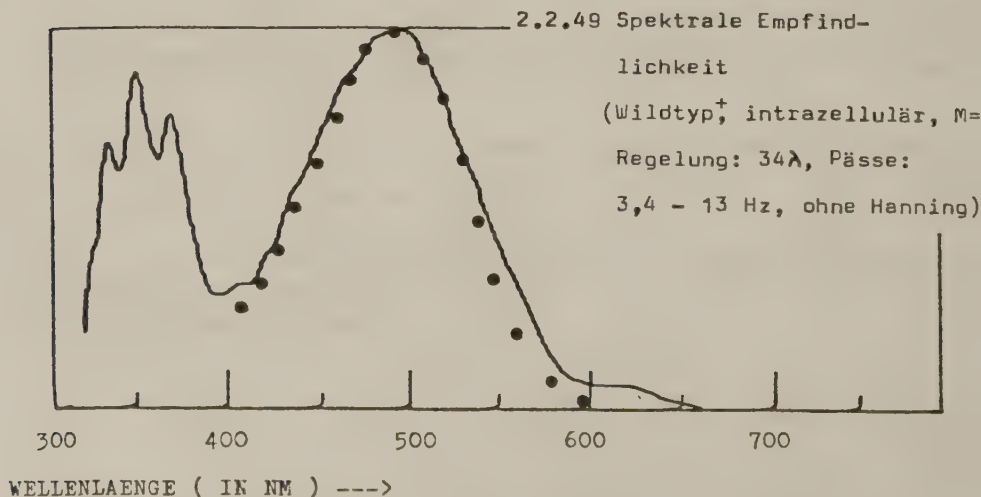


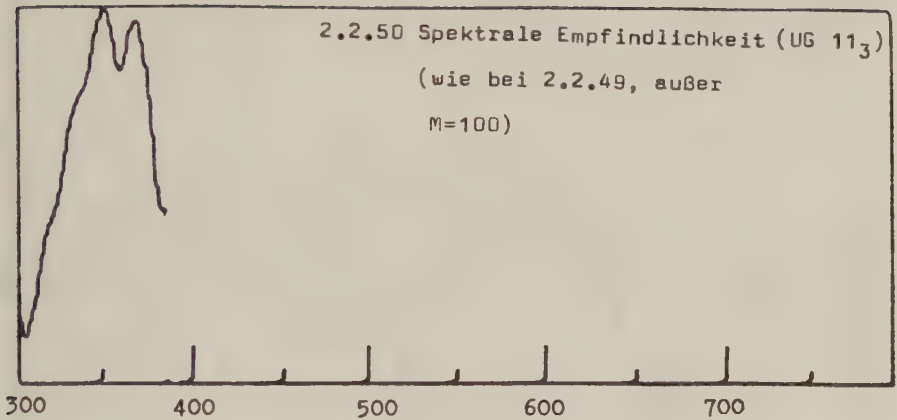


Die an einem anderen Tier gemessenen Empfindlichkeiten zeigen die Abbildungen 2.2.47 und 2.2.48. Die Empfindlichkeit im Sichtbaren ist vollkommen deckungsgleich mit der vorigen Messung. Die Empfindlichkeit im UV unterscheidet sich von der vorhergehenden nur durch die Höhe, nicht durch die Form. Die Relation der Empfindlichkeit im Sichtbaren zu der im UV ist verschieden und hängt vor allem von der Ernährung der Tiere ab (u.a. Kuo 1979).

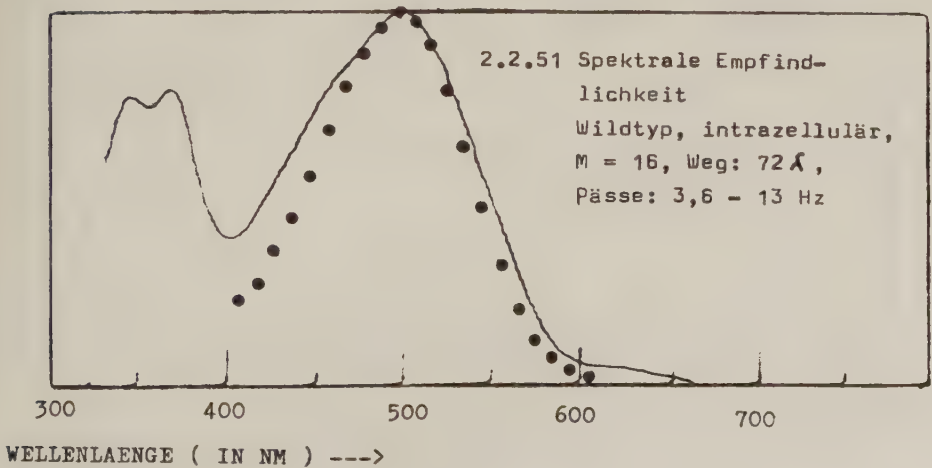


Es folgen jetzt intrazelluläre Ableitungen an Wildtyp-Männchen. Die Übereinstimmung im Sichtbaren mit der Rhodopsinkurve ist nicht mehr ganz so hoch, was sicher auf die Filterwirkung der Abschirmpigmente zurückzuführen ist. Wie oben schon angedeutet, ist die Einbruchstiefe der Feinstruktur im UV nicht so stark wie bei "Chalky"-Messungen. Die möglichen Ursachen dafür wurden diskutiert. Auf jeden Fall ist das Signal-Rausch-Verhältnis bei intrazellulären Ableitungen am Wildtyp schlechter als bei den vorigen Messungen, da hier im Vergleich zu "Chalky" der Streulichtanteil wesentlich vermindert ist und im Vergleich zu ERG-Messungen keine Summation von Einzelsignalen und damit keine Mittelung vorhanden ist. Dies zeigt sich vor allem bei den ohne spektrale Vorfilterung gemessenen Ganzspektren. Zur Verbesserung des Resultats ist es also, wie oben ausgeführt, notwendig, das Reizlicht auf den UV-Bereich zu beschränken. Dies führt dann zu der schon von "Chalky" her bekannten Feinstruktur im UV.

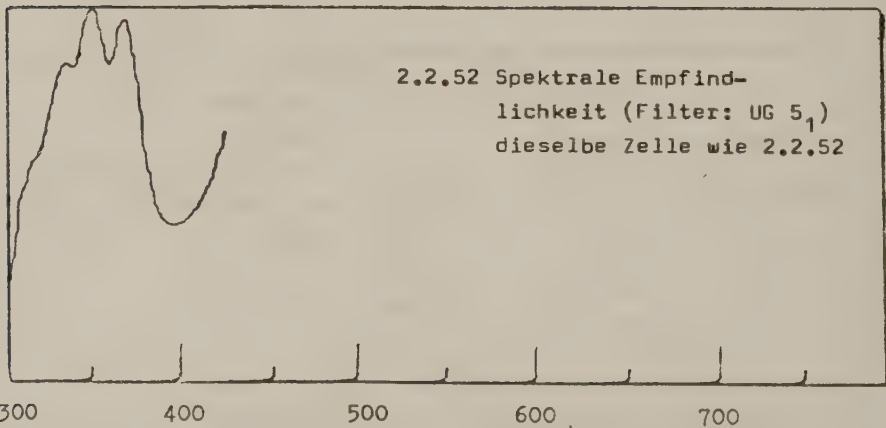
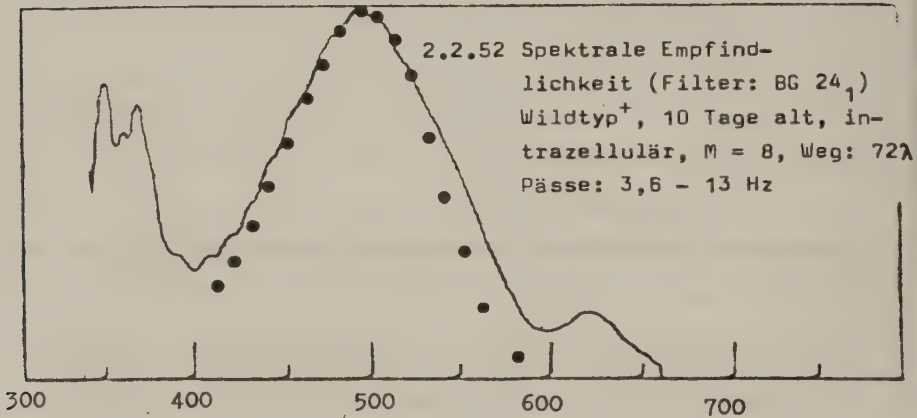




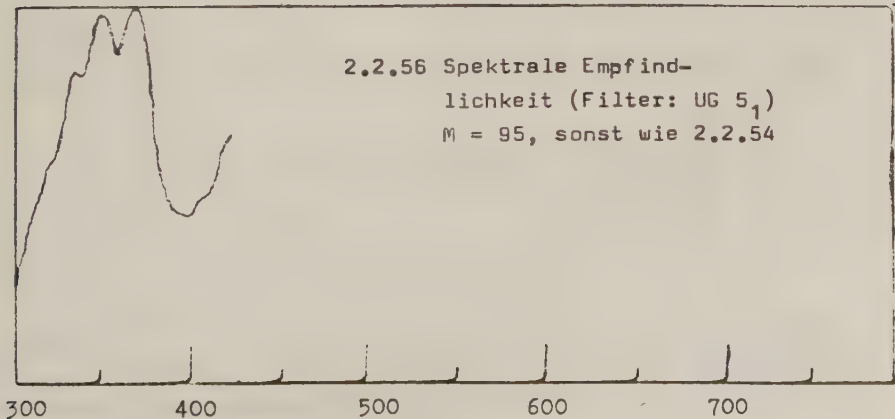
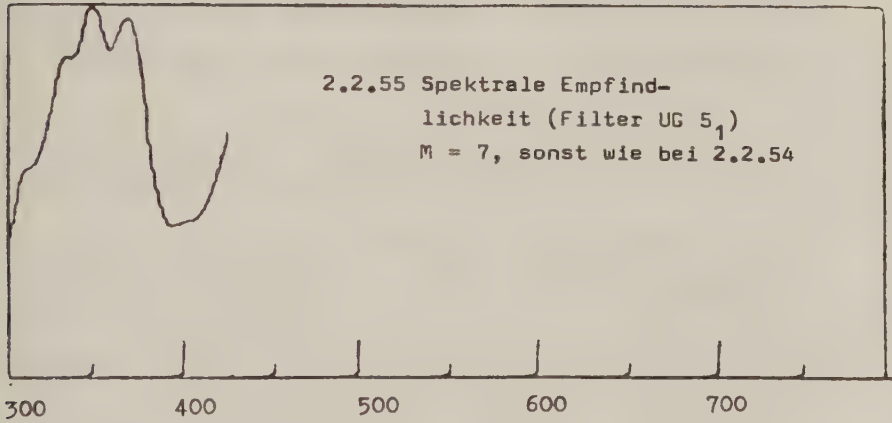
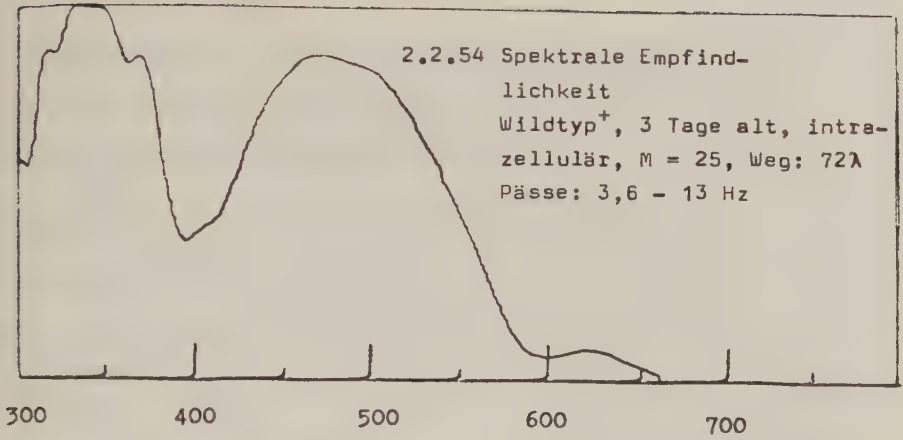
Die Abbildung 2.2.51 zeigt eine intrazelluläre Ableitung von einer außerhalb des Instituts gefangenen Calliphora. Sie sollte die Frage nach der natürlich vorkommenden UV-Empfindlichkeit abschätzen helfen.



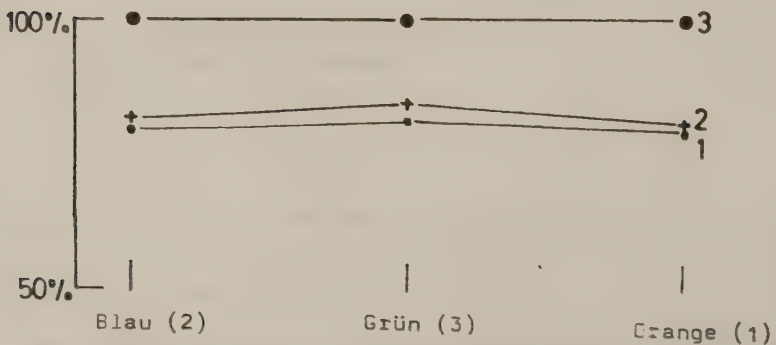
Die Abbildungen 2.2.52 bis 2.2.56 zeigen weitere intrazelluläre Ableitungen aus Wildtyp-Männchen, die aus der Zucht des Hauses stammten.



WELLENLAENGE (IN NM) ---->

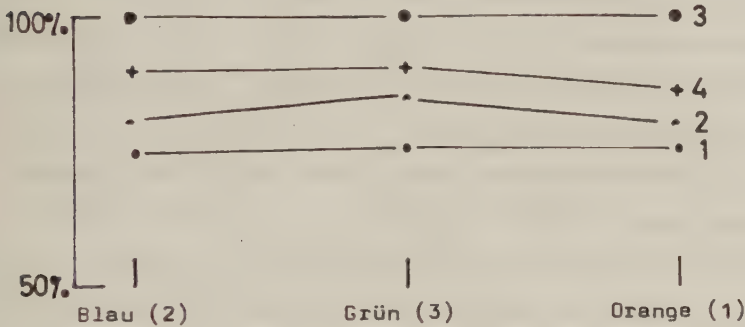


Eine Reihe weiterer Experimente diente zur Klärung der Frage, ob das Verhältnis der Empfindlichkeit im Sichtbaren im Vergleich zu der im UV durch chromatische Adaptation veränderbar ist und ob durch diese die UV-Struktur beeinflussbar ist. Die Abbildungen 2.2.57 und 2.2.58 zeigen Diagramme der relativen Höhen der Maxima bei 490 nm (1), bei 370 nm (2), bei 350 nm (3) und bei 333 nm (4). Die Extrema sind auf den Gipfel bei 350 nm (100 %) bezogen. Bei der Abbildung 2.2.58 wurde ein UV-anhebendes Filter (BG 24₁) verwendet. Das zusätzliche Adaptationslicht entstammt einer 250-Watt-Halogenlampe. Spektral wurde das Licht durch geeignete Interferenzfilter (bei 583 nm, 492 nm und 446 nm) eingengt. Die Stärke der Adaptationslichter wurde so eingestellt, daß das Versuchsobjekt als Reaktion bei Rechteckreizung gleiche Antworten liefert. Durch Abschwächung des Testlichtes wurde ein Verhältnis der Reaktionen auf Rechteckreizung mit dem Adaptationslicht bzw. mit dem Testlicht von 5:3 eingestellt. Dies erhöht natürlich auch das Rauschen, und Fehlerbreiten von 5 bis 10 % sind in Kauf zu nehmen. Sonstige Versuchsdaten: ERG, "Chalky⁺", zwei Tage alt.



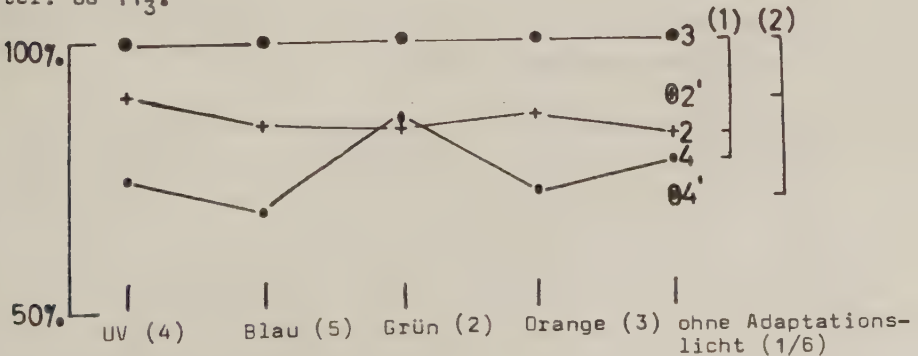
2.2.57 Chromatische Adaptation (Abszisse: Jeweil. Adaptationslicht, Ordinate: Relative Empfindlichkeit bei verschied. λ)

Die Zahlen nach der Interferenzfilterangabe auf der Abszisse geben die zeitliche Reihenfolge der Experimente an. Sie liegen ca. 10 Minuten auseinander.



2.2.58 Chromatische Adaptation (Filter: BG 24₁)

Ein weiteres chromatisches Adaptationsexperiment wurde mit höchster Intensität des Adaptationslichtes durchgeführt. Es diente der Lösung der Frage nach der prinzipiellen Beeinflussbarkeit der Gipfelstruktur im UV (Abbildung 2.2.59). Versuchsdaten: ERG, "Chalky", Mittelung einiger Einzelläufe, Filter: UG 11₃.



2.2.59 Chromatische Adaptation (Filter UG 11₃)

Am Anfang und am Ende des Experiments wurden Messungen ohne Adaptationslichter durchgeführt. Die Lage der Gipfel dabei wird durch die zwei rechten Skalen (1) und (2) gezeigt.

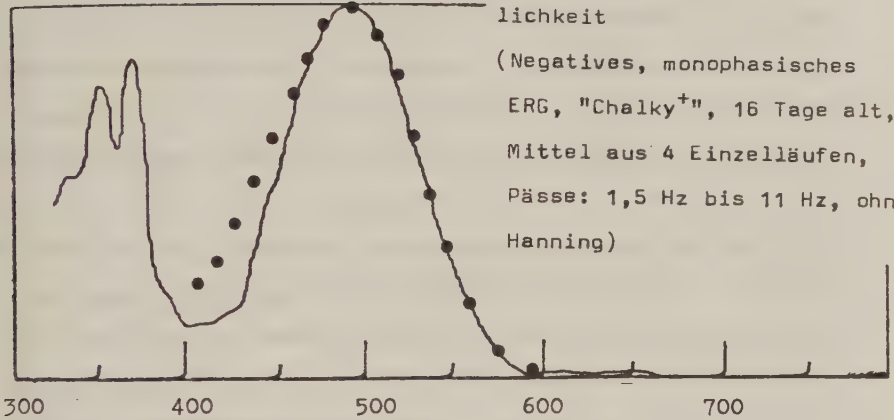
Unter Berücksichtigung der Fehlerbreiten läßt sich aus diesen Experimenten nur schließen, daß die UV-Feinstruktur durch chromatische Adaptation nicht zum Verschwinden gebracht werden kann und daß die Relation der Empfindlichkeit im UV zu der im Sichtbaren nicht beeinflussbar ist. Dieses Ergebnis ergaben schon frühere Messungen (u.a. Burkhardt 1962). Gewisse Veränderungen der relativen Höhen im UV werden sicher zum Teil durch das Rauschen verursacht, können aber auch, wie der Vergleich der Höhen vor und nach dem Experiment in Abbildung 2.2.59 zeigt, durch einen veränderten Frequenzgang entstehen. Die spektrale Lage der UV-Gipfel ändert sich bei den Adaptationsexperimenten nicht.

Die spektrale Empfindlichkeit einer rein hyperpolarisierenden ERG-Antwort konnte, wie schon oben erwähnt, einmal bestimmt werden (siehe die Abbildungen 2.2.60 und 2.2.61): Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß diese Reaktion rein aus der Retina stammt. Die Versuche zeigen also, daß die normale ERG-Antwort (biphasisch) bei FIS-Untersuchungen weitgehend retinale Bestandteile enthält.

2.2.60 Spektrale Empfind-

lichkeit

(Negatives, monophasisches
ERG, "Chalky+", 16 Tage alt,
Mittel aus 4 Einzelläufen,
Pässe: 1,5 Hz bis 11 Hz, ohne
Hanning)

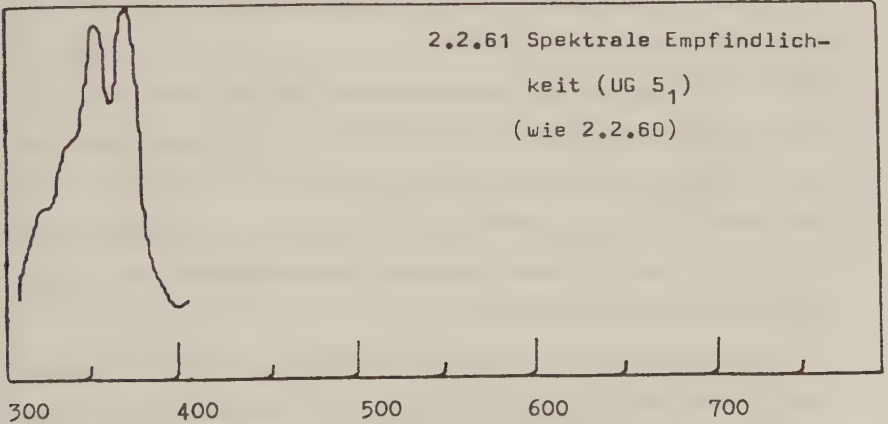


WELLENLAENGE (IN NM) ---->

2.2.61 Spektrale Empfindlich-

keit (UG 5₁)

(wie 2.2.60)



WELLENLAENGE (IN NM) ---->

Diskussion:

Die spektrale Empfindlichkeit von *Calliphora erythrocephala* zeigt im Ultraviolett eine Feinstruktur mit mehreren Gipfeln. Dies konnte durch extra- und intrazelluläre Ableitungen am Wildtyp und an "Chalky" gezeigt werden. Zur Demonstration des Sachverhalts eignen sich am besten die Summenpotentiale von "Chalky", da die Stabilität dieser Ableitungen höher ist als die der Ableitung von einzelnen Zellen. Diese Stabilität ist notwendig, damit man häufiger mitteln und somit die Form der Feinstruktur exakt feststellen kann (Abbildung 2.2.25). Daß die ERG-Antwort weitgehend der Antwort der Rezeptoren R1-6 entspricht, wurde schon diskutiert (S.118ff.). Die FIS-Messungen bestätigten dies ebenfalls. Zum einen zeigten die chromatischen Adaptationsexperimente, daß die Form der spektralen Empfindlichkeit, wie sie aus dem ERG gewonnen wird, weitgehend unveränderbar ist (S.144ff.). Zum anderen erbrachten die intrazellulären Ableitungen von R1-6 bei "Chalky" ähnliche Ergebnisse wie die Messungen mit dem Summenpotential (S.137ff.). Die Feinstruktur der UV-Empfindlichkeit, wie sie auch aus dem ERG gewonnen werden kann, stammt von den Rezeptoren R1-6.

Bemerkenswert ist weiterhin die gute Übereinstimmung der Empfindlichkeit im Sichtbaren mit einer theoretischen Rhodopsinkurve nach Dartnall (u.a.S.116). Dies ist, da auch bei ERG-Messungen feststellbar, ein neuer Hinweis darauf, daß die ERG-Antwort weitgehend die Reaktion der Rezeptoren R1-6 wieder-

spiegelt. Darüber hinaus zeigt dieses Ergebnis zusammen mit der hohen Stabilität der Messungen (u.a. S. 115ff., S.130ff.), wie präzise die Methodik von FIS ist.

Die beim Wildtyp vorhandenen Abschirmpigmente modifizieren etwas die Ergebnisse im Vergleich zu "Chalky" (S.140ff.). Aber auch hier ist die Empfindlichkeit im Sichtbaren sehr ähnlich der Rhodopsinkurve, und die UV-Feinstruktur bleibt erhalten.

Die Rezeptoren R7/8 haben maximale Empfindlichkeiten unter anderem im Ultraviolett und im Blauen (Smola u. Meffert 1979). Ihr Beitrag zum Summenpotential kann, wie gezeigt wurde, vernachlässigt werden. Die Rezeptoren R1-6 haben Empfindlichkeiten mit Maxima im Grün-Bereich und im UV. Die Ursache für die Empfindlichkeit im Sichtbaren ist sicher ein Rhodopsin ($\lambda_{\max}$ bei 493 nm).

Zur Erklärung der hohen UV-Empfindlichkeit wurden in Kapitel 1.2 verschiedene Hypothesen vorgestellt. Die durchgeführten chromatischen Adaptationsexperimente bestätigen erneut, daß die UV-Empfindlichkeit im Vergleich zur Empfindlichkeit im Sichtbaren nicht selektiv adaptierbar ist. Obwohl gewisse Einwände gegen diese Methode erhoben werden können (siehe Kirschfeld 1979), stützen die Adaptationsexperimente doch die Annahme, daß die Empfindlichkeit von R1-6 von einem einzigen System stammt. Bei Schmetterlingen war es nämlich möglich, die Relation der Empfindlichkeit im UV zu der im

Sichtbaren zu verschieben (Kap.2.3), was vermuten läßt, daß in diesem Fall ein Doppelsystem zugrundeliegt.

Insbesondere aber widerspricht die durch FIS-Messungen erstmalig belegte Feinstruktur der Annahme, daß die Empfindlichkeit im UV durch ein Rhodopsin-System verursacht wird.

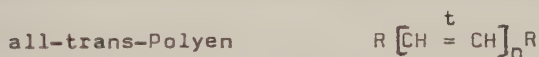
Als Ursache für die UV-Empfindlichkeit wurde auch der β -Peak des Rhodopsins diskutiert. Dagegen sprechen mehrere Gründe. Der β -Peak des Rhodopsins ist wesentlich kleiner als die tatsächlich beobachtete Empfindlichkeit. Weiterhin ist die UV-Empfindlichkeit durch Vitamin-A-reiche Kost verschiebbar (Kuo 1979). Schließlich widerspricht auch die jetzt beobachtete Feinstruktur dieser Annahme.

Aus diesen Überlegungen folgt, daß als wahrscheinlichste Erklärung die Satellitenpigmenttheorie zu gelten hat (Kirschfeld et al. 1977). Ein Hilfspigment gibt die im UV absorbierbare Energie an das Rhodopsin weiter. Die FIS-Messungen unterstützen diese Theorie und liefern zudem wichtige Hinweise auf die Art der zugrundeliegenden Substanz. Die gemessene Feinstruktur engt den Kreis der möglichen Satellitenpigmente stark ein.

Die im UV absorbierende Substanz verursacht die Feinstruktur. Eine Peak-Aufspaltung, wie von Snyder und Pask (1972) postuliert, kann nicht als Erklärung dienen. Danach soll eine Off-Axis-Belichtung zu einem Doppelpeak führen. Die FIS-Messungen zeigen aber keine Aufspaltung im Sichtbaren, die fünf-gipflige (!) Feinstruktur wird auch im ERG gefunden, und bei intrazellulären Ableitungen wurde das Präparat sorgfältig auf

maximale Antwort justiert.

Die Feinstruktur liefert Hinweise auf die Art der zugrundeliegenden Substanz. Wichtig sind dabei die Abstände zwischen den Maxima und die Lage des Maximums, das wellenlängenmäßig am höchsten gelegen ist (Scott 1964, Thomas 1968 und Williams & Fleming 1971). Spektren, deren Struktur eine Reihe von Banden zeigt, die jeweils 1450 cm^{-1} bis 1500 cm^{-1} voneinander entfernt liegen, sind typisch für all-trans-Polyene.



Die Position des am weitesten im Langwelligen gelegenen Maximums gibt Auskunft über die Zahl der konjugierten Doppelbindungen. Die Abbildung 2.2.62 zeigt Absorptionsspektren von Polyenen mit verschiedener Zahl konjugierter Doppelbindungen (aus Scott 1964).

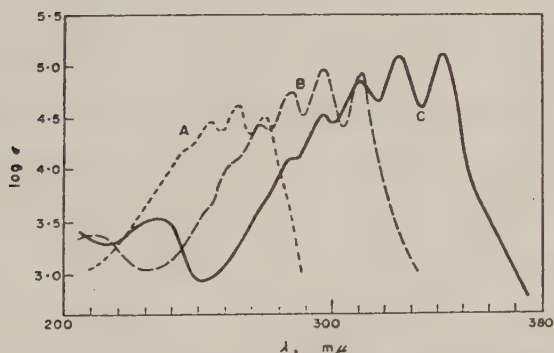
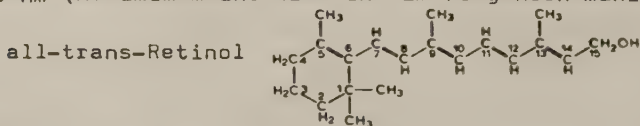


FIG. 2.1. Absorption spectra of dimethylpolyenes $\text{CH}_3(\text{CH}=\text{CH})_n\text{CH}_3$ (in hexane). A, $n = 3$; B, $n = 4$; C, $n = 5$. (Nayler and Whiting, *J. Chem. Soc.*, 3042, 1955.)

Die Spektren zeigen offensichtlich eine hohe Ähnlichkeit mit der im UV gemessenen Feinstruktur. Da hier die Abstände zwischen den ersten vier Peaks 1544 cm^{-1} , 1459 cm^{-1} und 1317 cm^{-1} betragen, besteht eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit dafür, daß die Empfindlichkeit im UV durch ein all-trans-Polyen verursacht wird. Das oberste Maximum bei 370 nm spricht für ein Polyen mit fünf konjugierten Doppelbindungen. Dessen oberstes Maximum würde theoretisch bei 342 nm liegen ($R: -\text{CH}_3$). Ein Polyen mit sechs konjugierten Doppelbindungen hätte ein Maximum bei 380 nm . Da eine bathochrome Verschiebung^x am ehesten wahrscheinlich ist, werden fünf Doppelbindungen angenommen. Eine Identifikation der das Spektrum verursachenden Substanz ist aber nicht ganz zweifelsfrei möglich, da Lage und Form des Spektrums auch vom Lösungsmittel, von den Substituenten oder von der Konfiguration des Moleküls abhängen.

Wichtige Hinweise auf die Art der zugrundeliegenden Substanz lieferte ein Gespräch mit Professor D. Oesterhelt vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München. Nach seinen Ausführungen könnte die Feinstruktur im UV folgende Ursachen haben. All-trans-Retinol hat ein Maximum bei 325 nm (Maximum meint hier und im folgenden maximale Absorption).

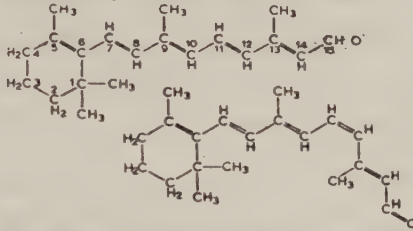


^xVerschiebung ins Langwellige. Hervorgerufen u.a. durch andere Substituenten (anstatt der Methylgruppen)

Das Absorptionsmaximum von all-trans-Retinal, das beim Sehvorgang aus 11-cis-Retinal entsteht, liegt bei 380 nm.

all-trans-Retinal

11-cis-Retinal



Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Professor Oesterhelt (Schreckenbach, Walckhoff und Oesterhelt 1977, 1978a, 1978b). am Bakterioopsin von Halobakterien zeigten, daß eine Anlagerung von Retinol an der Chromophorenbindungsstelle des Opsins zu einer planaren Konformation des Retinal-Analogons führt. Dies führt zu einer Veränderung des Absorptionsspektrums von Retinol. Das Absorptionsmaximum findet sich nun bei 357 nm und das Spektrum zeigt eine ausgeprägte Feinstruktur (Abbildung 2.2.63 entnommen aus Schreckenbach, Walckhoff u. Oesterhelt 1978a).

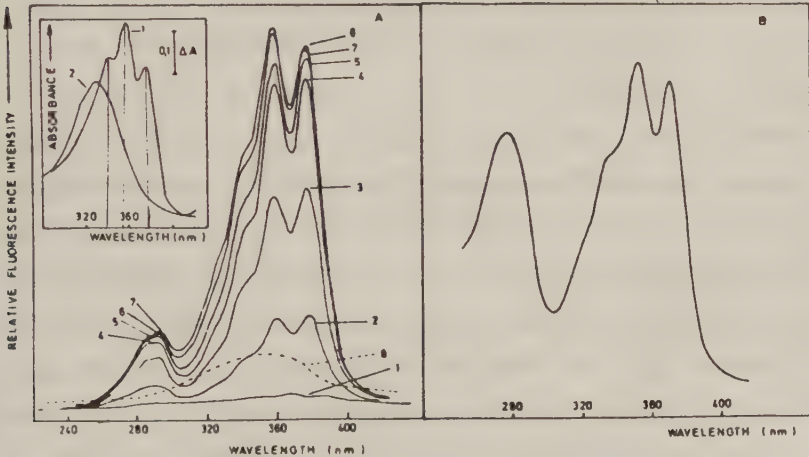


Figure 4. Properties of retinol in the binding site. A: Titration of an apomembrane suspension (0.55 μ M bacterio-opsin) with retinol. (1) fluorescence excitation spectrum of bacterio-opsin. (2) (7): increasing amounts of all-trans retinol were added to the cuvette and the spectra recorded after each addition. The molar ratio of retinol: bacterio-opsin was 0.15 (2), 0.47 (3), 0.78 (4), 1.09 (5), 3.12 (6), 4.69 (7). (8): retinol (0.82 μ M final concentration) was added after taking spectrum (7), the cuvette incubated at 25°C for 10 min and the spectrum recorded again. The same spectrum as (8) was obtained when retinol (0.82 μ M) was added prior to the addition of an 4.69 fold molar excess of retinol. All spectra are uncorrected. Emission was measured at 470 nm wavelength. Inset: (1) Absorption spectrum of product RP₄₀₀. (2) Spectrum of (1) after addition of CTAB (0.01 M final concentration). B: Corrected fluorescence spectrum of product RP₄₀₀ (1 μ M bacterio-opsin).

Einige reduzierte Chromophoren zeigen auch eine Planarität des Cyclohexanrings mit der Seitenkette, was durch eine Doppelbindung zwischen den C-Atomen 6 und 7 verursacht wird. Dies führt ebenfalls zu einer bathochromen Verschiebung und zu einer Mehrgipfeligkeit (Abb.2.2.64 aus Schreckenbach, Walckhoff und Oesthelt 1977)

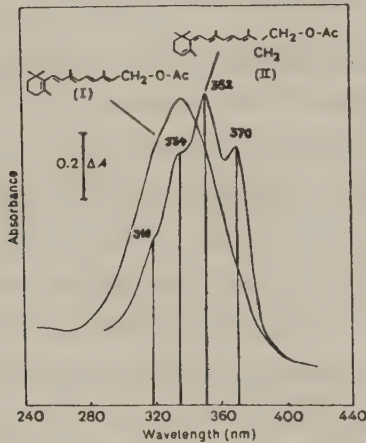


Fig.1. Absorption characteristics of retinyl compounds. Absorption spectra of retinyl acetate (I) and retroretinyl acetate (II) in chloroform. Retroretinyl acetate was prepared from retinyl acetate according to [13]

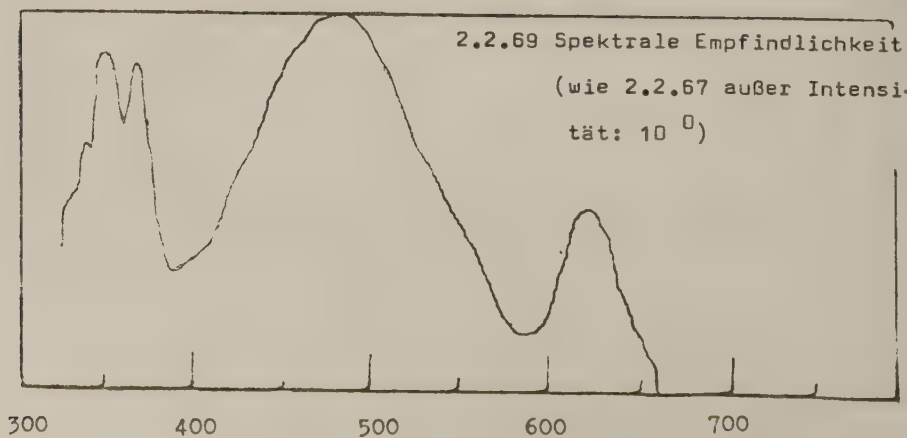
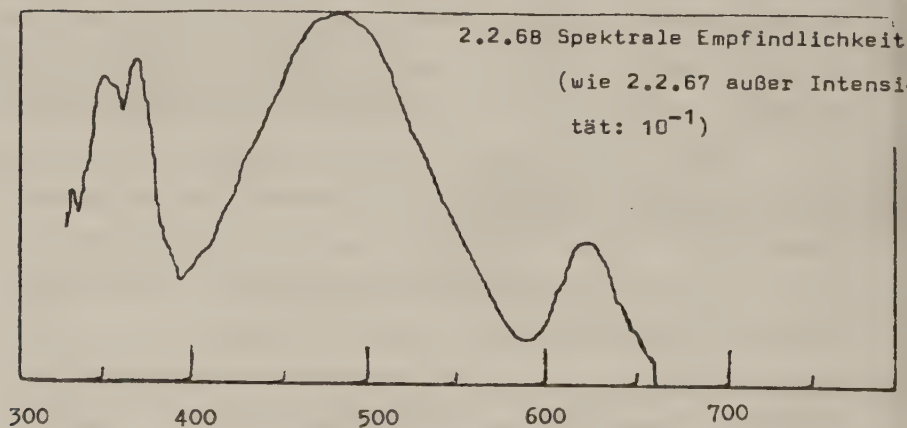
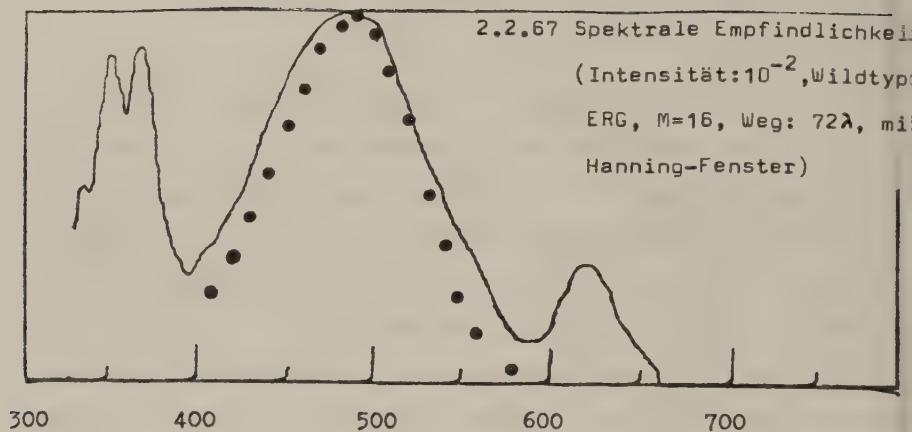
2.2.64

Die gute Übereinstimmung dieser Spektren in Lage und Form mit der gemessenen Feinstruktur im UV läßt als Satellitenpigment eine Retinol-ähnliche Verbindung (Retroretinol bzw. Retinol -durch Bindung an das Rhodopsin-in planarer Struktur) möglich erscheinen. Die gemessene Vitamin-A-Abhängigkeit der UV-Empfindlichkeit (u.a. Kuo 1979) spricht auch für eine Retinol-ähnliche Substanz. Die im UV nicht vorhandene Polarisationsempfindlichkeit (auch Kuo 1979) spricht für die Annahme eines freien Moleküls d.h. für Retroretinol.

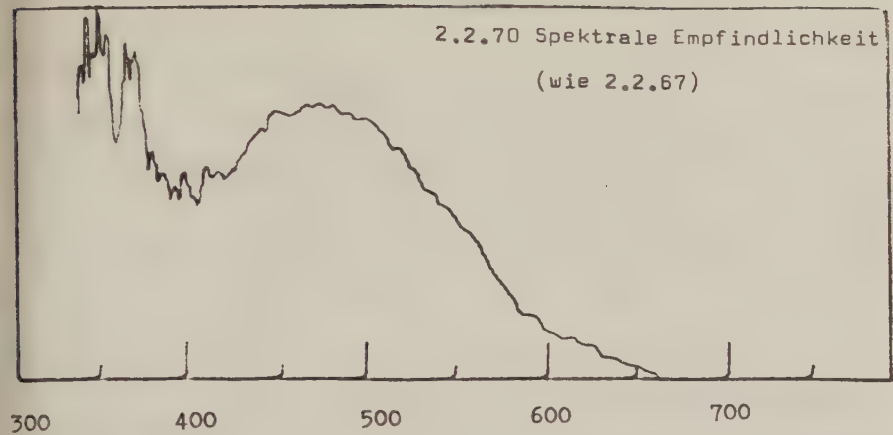
Nun soll noch diskutiert werden, warum diese Feinstruktur früher nicht gemessen werden konnte. Wie oben schon mehrfach erwähnt wurde (u.a. 126ff.), besitzen FIS-Messungen eine wesentlich höhere Auflösung als frühere Messungen. Bei einer Bestimmung der UV-Empfindlichkeit mit wenigen Interferenzfiltern lassen sich Feinstrukturen nicht messen. Diese Filter haben zudem meist Halbwertsbreiten von mindestens 20 nm. Die einzigen dem Verfasser bekannten Messungen, die möglicherweise eine Feinstruktur im UV andeuten, sind mikrospektralfotometrische Messungen von Langer (siehe die vom Verfasser eingezeichneten Pfeile (im UV) in Abb. 2.2.7). Bei diesem Verfahren ist die Auflösung höher als bei den üblichen aktionsspektrometrischen Messungen. Die einzigen dem Verfasser bekannten elektrophysiologischen Messungen, die mit einer dichten Packung von Interferenzfiltern im UV durchgeführt wurden, sind die Messungen von Walther und Dodt (1959). Auch diese deuten eventuell ein Doppelgipfligkeit an (siehe die vom Verf. eingezeichneten Pfeile in Abb. 2.2.65). Die Begrenzung der Genauigkeit des Verfahrens durch die Halbwertsbreite der Filter ist aber eine unüberwindliche Schranke (Abb. 2.2.66). Naturgemäß hat ein aktionsspektrometrisches Verfahren mit hoher Auflösung und Stabilität (!), wie die fourierinterferometrische Stimulation es darstellt, entscheidende Vorteile auch gegenüber der Mikrospektralfotometrie. Bei aktionsspektrometrischen Methoden wie bei FIS kann besser unterschieden werden zwischen Substanzen, die am Sehvorgang beteiligt sind, und anderen Molekülen, die für den strukturellen Aufbau verantwortlich sind.

Bevor weitere Ergebnisse vorgestellt werden, die den Beginn neuer Meßreihen mit FIS darstellen, sollen Verbesserungsmöglichkeiten diskutiert werden. Die wichtigste noch notwendige Verbesserung von FIS ist die laufende Überwachung des Frequenzgangs der Zellen, da eine gewisse Beeinflussung der gemessenen spektralen Empfindlichkeiten durch ihn nicht auszuschließen ist (relative Höhe der UV-Gipfel, Relation UV - sichtbarer Bereich). Daran wird gegenwärtig gearbeitet. Der Frequenzgang soll durch einen komplexen Sinusreiz (Fritz 1977) laufend gemessen werden. Daneben sind noch Verbesserungen des Geräts an den Grenzen des momentanen Meßbereichs notwendig (UV: Strahlenteiler, Lichtquelle - Rotbereich: Fotomultiplier).

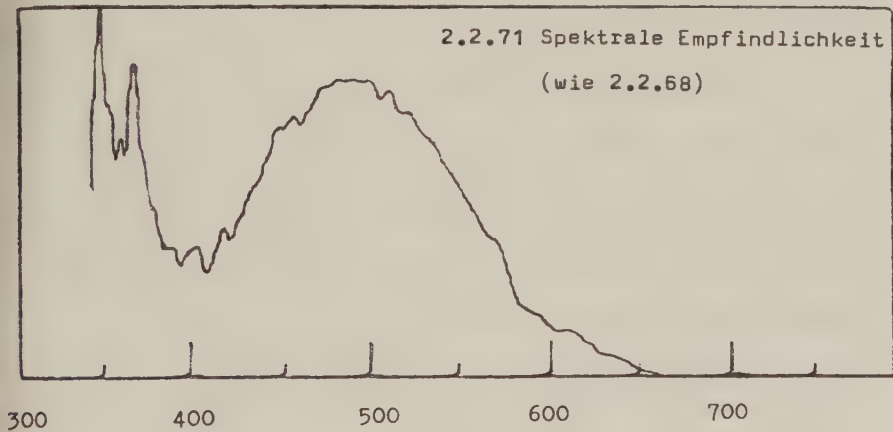
Die ersten Ergebnisse zum Thema "Beeinflussung der spektralen Empfindlichkeit durch Abschirmpigmente" stellen die Abbildungen 2.2.67 bis 2.2.72 dar. Es handelt sich um ERG-Messungen am Wildtyp bei verschiedenen Intensitäten. Deutlich erkennbar ist dabei etwa die Erhöhung der Rotempfindlichkeit. Sie wird durch die hohe Durchlässigkeit der Ommochrome in diesem Spektralbereich erklärt (Goldsmith 1965). Die Abschirmpigmente beeinflussen die Empfindlichkeit aber auch in anderen Spektralbereichen (Abb. 2.2.70 bis 2.2.72).



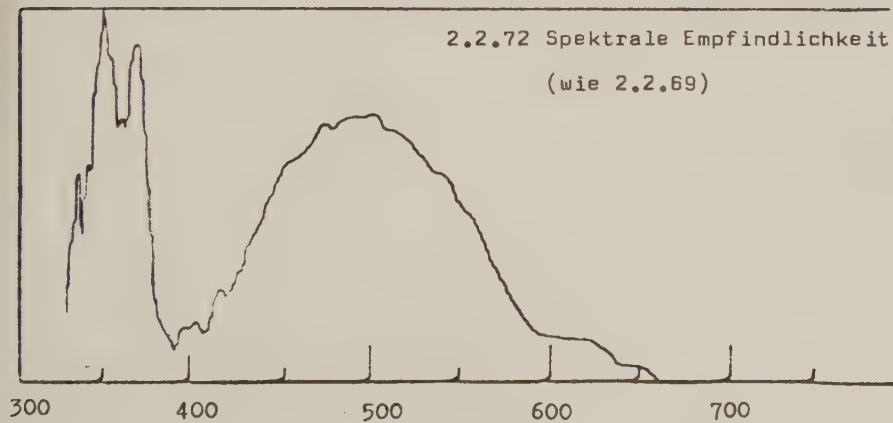
2.2.70 Spektrale Empfindlichkeit
(wie 2.2.67)



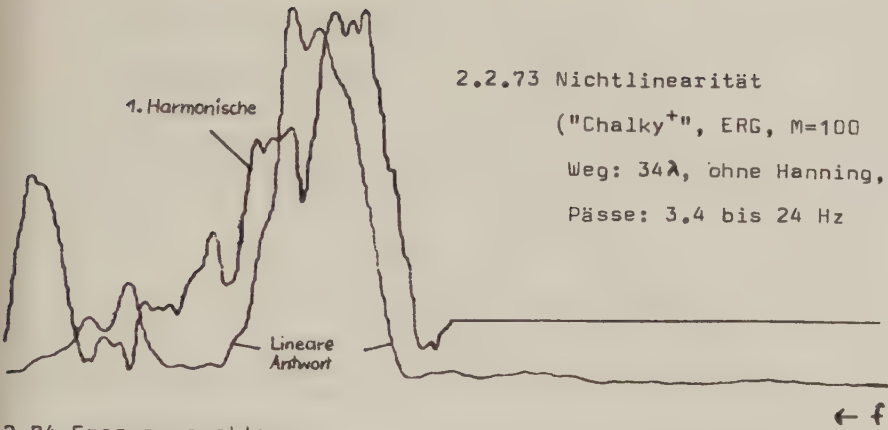
2.2.71 Spektrale Empfindlichkeit
(wie 2.2.68)



2.2.72 Spektrale Empfindlichkeit
(wie 2.2.69)



Am Ende dieses Kapitels steht eine kurze Erörterung der nichtlinearen Anteile an den Sehzellreaktionen. Schon in Kapitel 1. wurde ausgeführt, daß die harmonischen Schwingungen die Bestimmung der spektralen Empfindlichkeit nicht stören. Eine Analyse der nichtlinearen Anteile liefert eventuell sogar wichtige Erkenntnisse. Eine ausführliche Diskussion wäre aber momentan verfrüht, da die Untersuchungen von Form und Größe der nichtlinearen Anteile in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern erst am Anfang stehen. So sollen hier nur typische Nichtlinearitäten, wie sie extrazellulär (Abbildungen 2.2.73 bis 2.2.75) und intrazellulär (Abbildungen 2.2.76 und 2.2.77) bei "Chalky" gemessen werden können, vorgestellt werden. Teils ist das unkorrigierte Antwortspektrum zu sehen, teils wurde die erste harmonische Schwingung über die unkorrigierte Grundantwort gezeichnet. Auffallend ist neben der vor allem bei extrazellulären Messungen feststellbaren nicht sehr guten Übereinstimmung der Haupt-Peaks, die sehr geringe nichtlineare Verzerrung der UV-Reaktion. Dies könnte Hinweise auf den Mechanismus der UV-Empfindlichkeit liefern.



2.2.73 Nichtlinearität

("Chalky+", ERG, M=100

Weg: 34λ , ohne Hanning,

Pässe: 3.4 bis 24 Hz

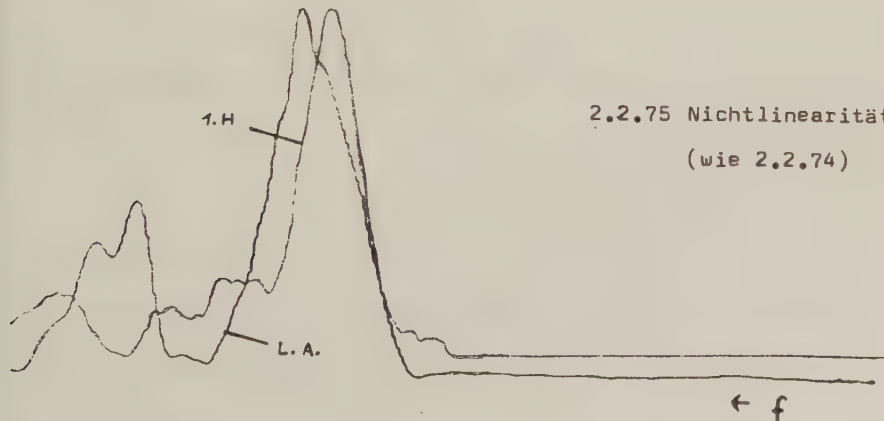
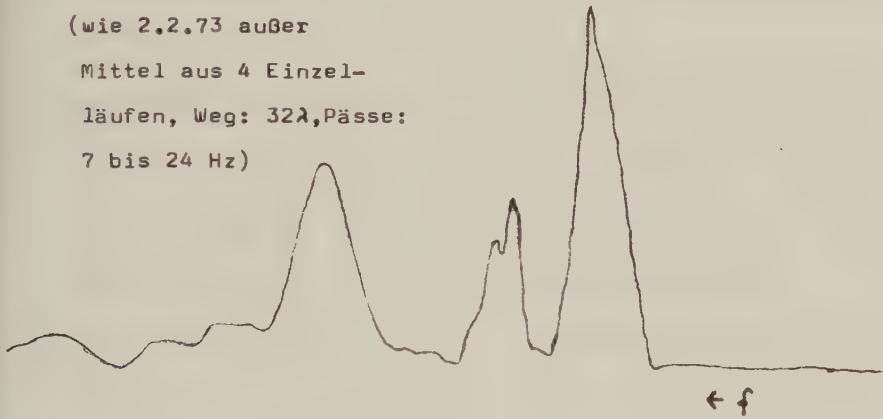
2.2.74 Frequenzspektrum

(wie 2.2.73 außer

Mittel aus 4 Einzel-

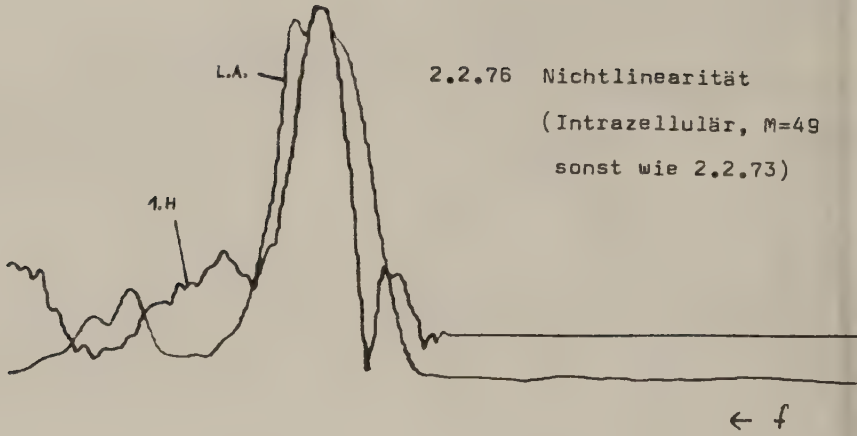
läufen, Weg: 32λ , Pässe:

7 bis 24 Hz)

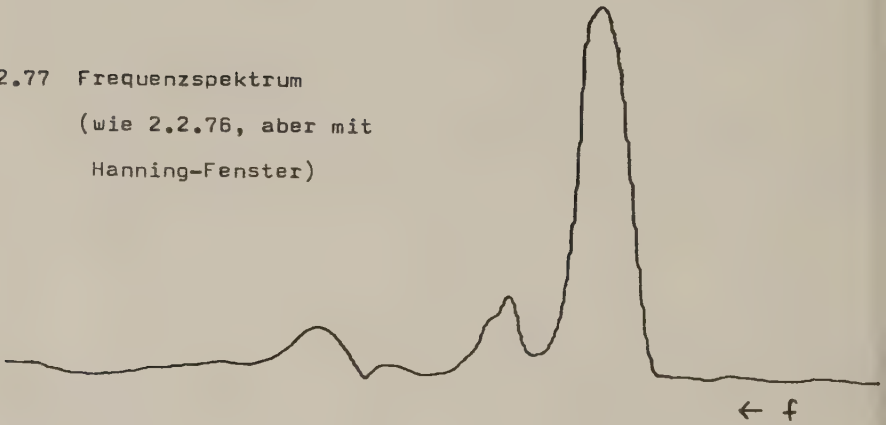


2.2.75 Nichtlinearität

(wie 2.2.74)



2.2.77 Frequenzspektrum
(wie 2.2.76, aber mit
Hanning-Fenster)



2.3 Die Bestimmung der spektralen Empfindlichkeit bei Mensch und Schmetterling

An zwei weiteren Versuchsobjekten wurden spektrale Empfindlichkeiten mit FIS gemessen. Zum einen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. R. Adamczyk von der Augenklinik der Universität München mehrere Versuchsreihen am Menschen durchgeführt, deren Ziel es war, aus dem Auge (ERG) eine Antwort auf den Interferogrammreiz zu erhalten und festzustellen, ob daraus auf unterschiedliches Farbsehvermögen der Versuchspersonen zu schließen ist.

Das Licht aus dem Interferometer wurde mit Hilfe zweier Spiegel auf eine Öffnung in einem großen Holzkasten, in dem die Versuchsperson saß, abgebildet. Die Reaktion wurde entweder mit einer innen beschichteten Haftschale oder mit präparierten Baumwollfäden abgenommen. Es zeigte sich, daß ein Antwortinterferogramm ableitbar war. Es gab aber Probleme bei der Ableitung der Signale (Störung durch Lidschläge, geringe Signalstärke (μ Volt)). Bei geübten Versuchspersonen waren die Antworten wesentlich störungsfreier als bei ungeübten. Bei letzteren führten hohe Mittelungsraten zum Erfolg. Die den Interferogrammen zugeordneten spektralen Empfindlichkeiten entsprachen mehr oder weniger den skotopischen Empfindlichkeiten, wie sie von psychophysischen Messungen her bekannt sind. Bei Versuchspersonen, deren Farbuntüchtigkeit genau charakterisiert war, ließen sich Unterschiede feststellen, die mit der vorher gestellten Diagnose in Übereinstimmung waren. Die Ergebnisse wurden von Dr. Gemperlein auf mehre-

ren Kongressen vorgestellt und publiziert, u.a. auf der MEDINFO 80 in Tokio (Gemperlein 1980).

Um die Vielseitigkeit der Methodik von FIS zu demonstrieren, soll hier eines der Meßergebnisse gezeigt werden (Abbildung 2.3.1 aus Gemperlein 1980).

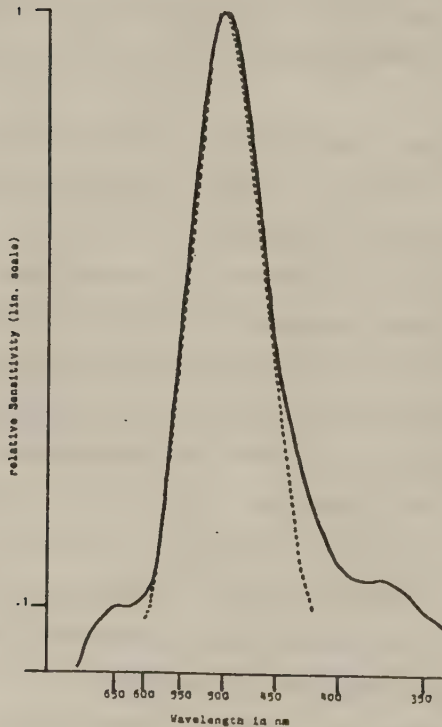
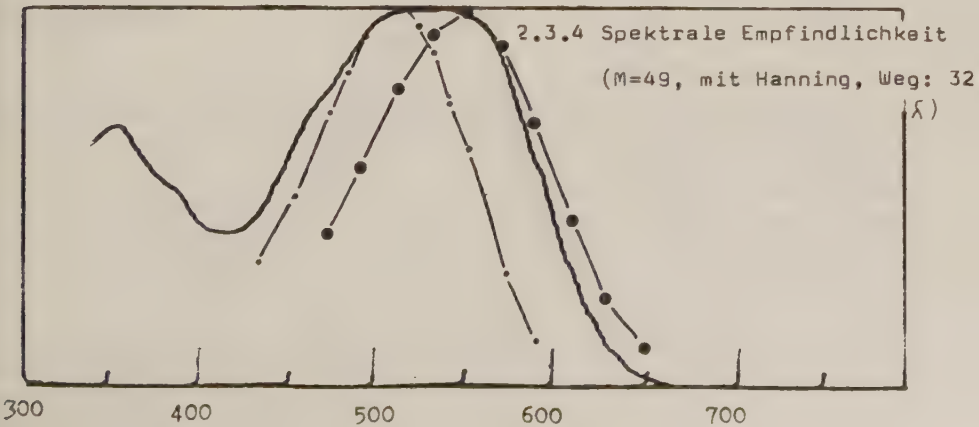
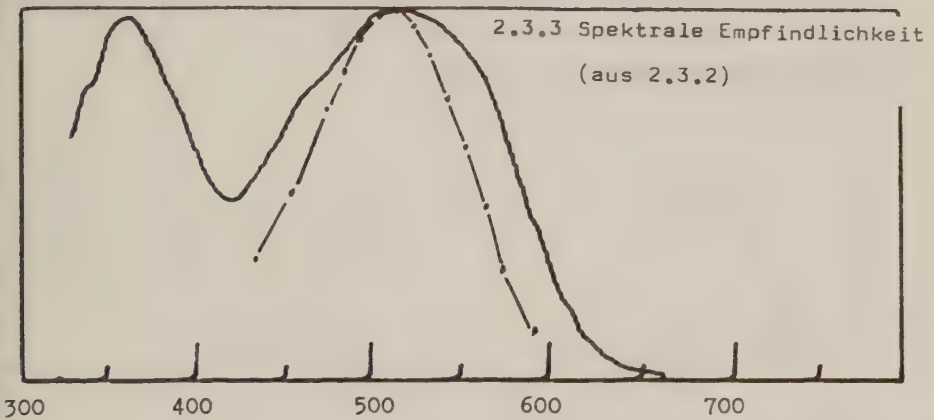
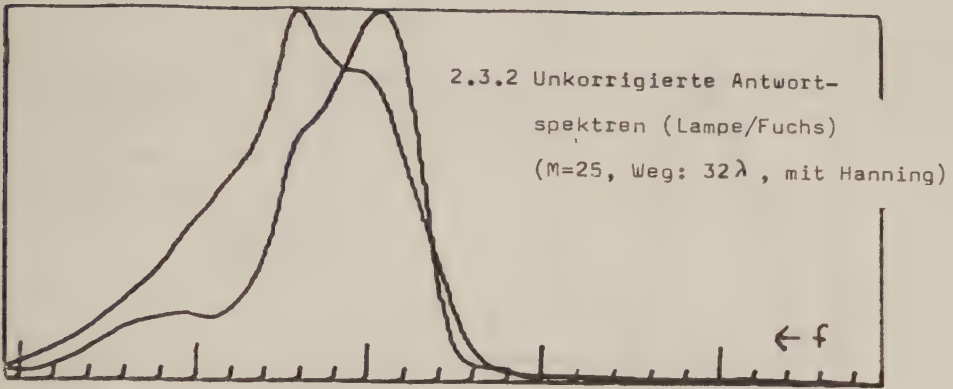
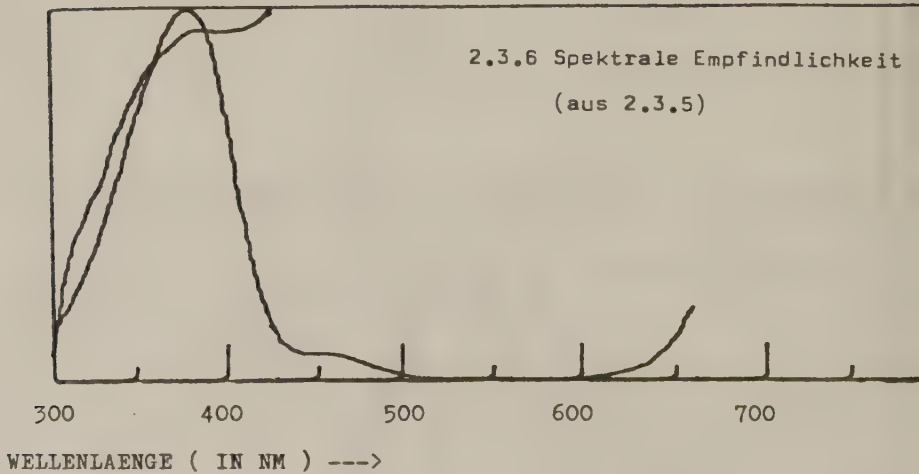
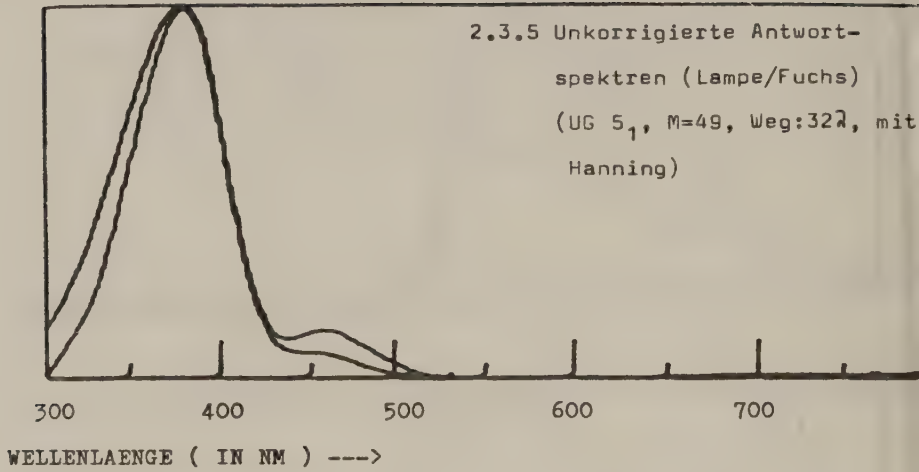


Figure 3 : Relative spectral sensitivity of the right human eye as computed from the response of Fig. 2 compared to the wellknown scotopic sensitivity curve of the human eye as measured by psychophysical experiments (pointed, after TRENDELENBURG).

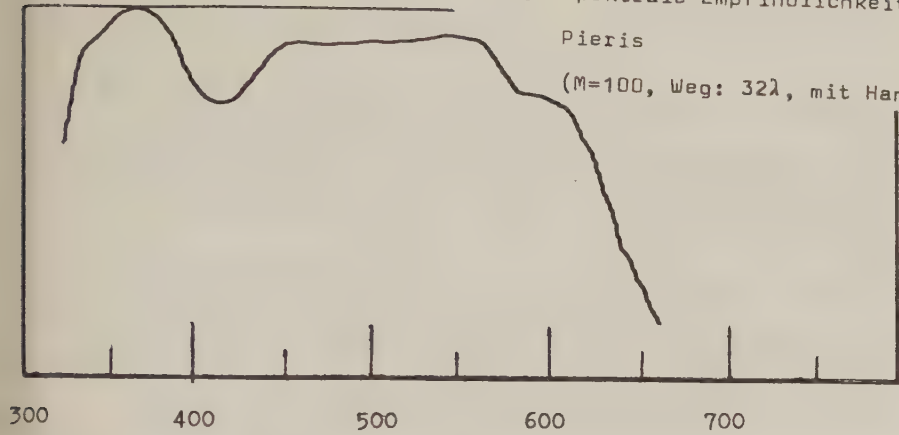
Zum anderen wurden ERG-Antworten von zwei Schmetterlingsarten, nämlich *Pieris brassicae* und *Aglais urticae*, untersucht. Es zeigte sich, daß deren Gesamtempfindlichkeiten wesentlich breiter sind und weiter im Langwelligen liegen als die Empfindlichkeit von *Calliphora erythrocephala*. Eine UV-Reaktion ist auch vorhanden. Die UV-Empfindlichkeit zeigt hier aber keine Feinstruktur! Es dürfte sich also um ein eigenes Rhodopsin-System handeln. Diese Vermutung wurde durch chromatische Adaptationsexperimente erhärtet, die zeigten, daß die UV-Sichtbar-Relation der Empfindlichkeit stark veränderbar ist. Die Abbildungen 2.3.2 bis 2.3.8 zeigen zuerst Ergebnisse beim Fuchs und dann beim Kohlweißling, die von Herrn A. Steiner und vom Verfasser erzielt wurden. Die hohe Breite der Empfindlichkeiten läßt mehrere Rhodopsine vermuten. So sind beim Fuchs zwei Rhodopsin-Kurven mit $\lambda_{\max} = 510 \text{ nm}$ und $\lambda_{\max} = 550 \text{ nm}$ eingetragen. Beim Fuchs könnte es sich um drei, beim Kohlweißling um vier Rhodopsine handeln, wobei immer ein Rhodopsin mit maximaler Empfindlichkeit im Ultravioletten vorhanden ist. Bei dem Versuch, die Gesamtempfindlichkeit durch Rhodopsine nach dem Dartnall-Nomogramm zu beschreiben, muß aber in Betracht gezogen werden, daß bei großen und kleinen Wellenlängen die Rhodopsine von der theoretischen Nomogrammkurve abweichen (Greenberg, Honig u. Ebrey 1975). Einen sehr schönen Nachweis der Existenz zweier Rhodopsinsysteme zwischen 400 und 600 nm zeigt die Abbildung 2.3.9. Hier wurde durch chromatische Adaptation mit Licht eines Argon-Lasers schrittweise die Empfindlichkeit zugunsten des bei kürzeren Wellenlängen liegenden Rhodopsins verschoben. Die Stärke der Adaptationslichter wurde so eingestellt, daß sie

zu gleichen Rechteckantworten führte. Die Reaktion auf das Adaptationslicht war dreimal so stark wie die Reaktion auf das Testlicht. Die gepunktete Kurve ist die Empfindlichkeit ohne Adaptationslicht. Als letztes sei noch erwähnt, daß die Empfindlichkeit der Schmetterlinge unter anderem in Abhängigkeit von der Augenregion eine starke Variabilität zeigt.

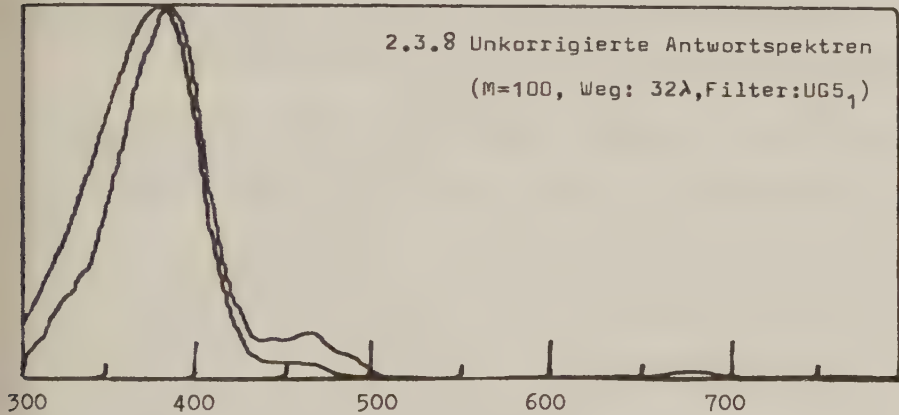




2.3.7 Spektrale Empfindlichkeit von
Pieris
($M=100$, Weg: 32λ , mit Hanning)



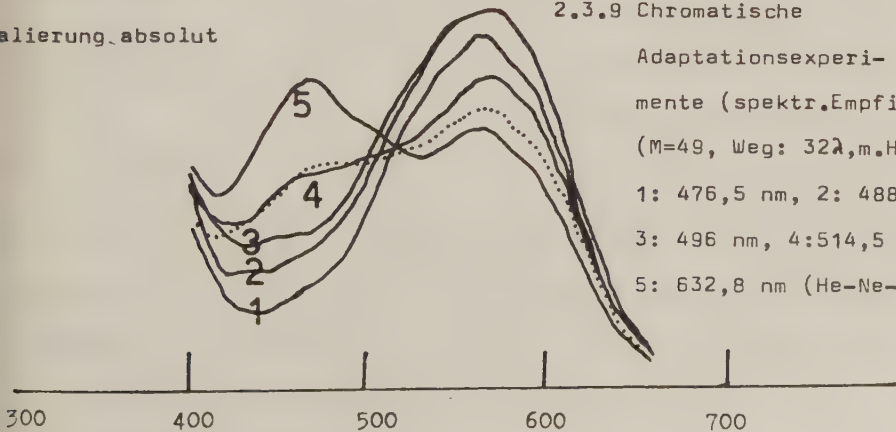
2.3.8 Unkorrigierte Antwortspektren
($M=100$, Weg: 32λ , Filter: $UG5_1$)



alierung, absolut

2.3.9 Chromatische

Adaptationsexperi-
mente (spektr. Empfindl.)
($M=49$, Weg: 32λ , m. Hann.)
1: 476,5 nm, 2: 488 nm,
3: 496 nm, 4: 514,5 nm,
5: 632,8 nm (He-Ne-Laser)



Literaturverzeichnis

- Autrum, H., Autrum, I., Hoffmann, Chr.: Komponenten im Retinogramm von *Calliphora* und ihre Abhängigkeit von der Spektralfarbe, *Biologisches Zentralblatt*, 1961, Bd. 80 H. 5, 513-547.
- Autrum, H., Zwehl, V. v.: Zur spektralen Empfindlichkeit einzelner Sehzellen der Drohne (*Apis mellifica*), *Z. vergl. Physiol.* 46, 1962, 8-12.
- dies.: Die spektrale Empfindlichkeit einzelner Sehzellen des Bienenauges, *Z. vergl. Physiol.* 48, 1964, 357-384.
- Bell, R.J.: *Introductory Fourier Transform Spectroscopy*, Academic Press, New York, 1972.
- Burkhardt, D.: Spectral sensitivity and other response characteristics of single visual cells in the arthropod eye, *Symp. Soc. exp. Biol.* 16, 1962, 86-109.
- Cooley, J.W., Tukey, J.W.: An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series, *Math. of Comput.*, vol. 19, 1965, 297-301.
- Dartnall, H.J.A.: The interpretation of spectral sensitivity curves, *Brit. Med. Bull.* 9, 1953, 24-30.
- Förster, T.: *Fluoreszenz organischer Verbindungen*, Vandenhoeck und Ruprecht, Göttingen 1951.
- Frisch, K. v.: Demonstration von Versuchen zum Nachweis des Farbensinns bei angeblich total farbenblinden Tieren, *Verh. dtsh. Zool. Ges. Freiburg 1914*. Berlin (1914)
- Fritz, N.: Die Abhängigkeit des linearen Übertragungsverhalten der Sehzellen der Schmeißfliege vom Ruhepotential: Gemessen mit einfachen und komplexen Sinusreizen, Diplomarbeit an

- der Universität München, 1977.
- ders.: "Kopf". An Assembler Programm System for Time Series Analysis, unveröff. Manuskript, 1977.
- Gemperlein, R.: Fourier Interferometric Stimulation (FIS), A new method for the analysis of spectral processing in visual systems, MEDINFO 80, Proceedings of the Third World Conference on Medical Informatics, Tokyo 1980.
- Gemperlein, R., McCann, G.D.: A Study of the Response Properties of Retinula Cells of Flies Using Nonlinear Identification Theory, Biol. Cybernetics 19, 1975, 147-158.
- Gemperlein, R., Smola, U.: Übertragungseigenschaften der Sehzelle der Schmeißfliege *Calliphora erythrocephala*, 1. Abhängigkeit vom Ruhepotential, J. comp. Physiol. 78, 1972, 30-52.
- Gemperlein, R., Parsche, H., Paul, R.: Dynamic Spectral Analysis of Visual Cells by Fourier Spectroscopy, Naturwissenschaften 64, 1977, 275.
- Gemperlein, R., Paul, R., Lindauer, E., Steiner, A.: UV Fine Structure of the Spectral Sensitivity of Flies Visual Cells, Revealed by FIS (Fourier Interferometric Stimulation), Naturwissenschaften 67, 1980, 565.
- Goldsmith, T.H.: The visual system of the honeybee, Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 44, 1958, 123-126.
- ders.: Do flies have a red-receptor? J. gen. Physiol. 49, 1965, 265-287.
- Goldsmith, T.H., Fernandez, H.R.: The sensitivity of housefly photoreceptors in the mid-ultraviolet and the limits of the visible spectrum, J. Exp. Biol. 49, 1968, 669-677.

- Goldsmith, T.H., Warner, L.T.: Vitamin A in the vision of insects, *J. gen. Physiol.* 47, 1964, 433-441.
- Greenberg, A.D., Honig, B., Ebrey, Th.G.: Wavelength dependence of the bandwidths of visual pigment spectra, *Nature*, Vol. 257, 1975, 823-824.
- Hamdorf, K., Paulsen, R., Schwemer, J., Täuber, U.: Biochemistry of Visual Pigments, 1. Photoreconversion of invertebrate visual pigments, *Information Processing in the Visual System of Arthropods*, ed. R. Wehner, Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1972.
- Hoffmann, Chr., Langer, H.: Die spektrale Augenempfindlichkeit der Mutante "chalky" von *Calliphora erythrocephala*, *Naturwissenschaften* 18, 1961, 605-607.
- Horridge, G.A., Mimura, K.: Fly photoreceptors, 1. Physical separation of two visual pigments in *Calliphora* retinula cells 1-6, *Proc. Roy. Soc. Lond. (Biol.)* 190, 1975, 211-224.
- Kirschfeld, K.: The Function of Photostable Pigments in Fly Photoreceptors, *Biophys. Struct. Mechanism* 5, 1979, 117-128.
- Kirschfeld, K., Franceschini, N.: Ein Mechanismus zur Steuerung des Lichtflusses in den Rhabdomeren des Komplexauges von *Musca*, *Kybernetik*, Bd. 6, 1969, H. 1, 13-22.
- Kirschfeld, K., Feiler, R., Franceschini, N.: A Photostable Pigment within the Rhabdomere of Fly Photoreceptors No. 7, *J. comp. Physiol.* 125, 1978, 275-284.
- Kirschfeld, K., Franceschini, N., Minke, B.: Evidence for a sensitising pigment in fly photoreceptors, *Nature* 269, 1977, 385-390.
- Künn, A.: Über den Farbensinn der Bienen, *Z. vergl. Physiol.* 5, 1927, 762-800.

- Kuhn, H.: Energieübertragungsmechanismen, Biophysik, Ein Lehrbuch, ed. W. Hopp e, W. Lohmann, H. Markl, H. Ziegler, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1977, 187-197.
- Kuiper, J.W., Leutscher-Hazelhoff, J.T.: Linear and nonlinear responses from the compound eye of *Calliphora erythrocephala*. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 30, 419-428 (1965)
- Kuo, Ai-ke: Elektrophysiologische Untersuchungen zur Spektral- und Polarisationsempfindlichkeit an den Sehzellen von *Calliphora erythrocephala*, Diss. München 1979.
- Langer, H.: Metarhodopsin in Single Rhabdomeres of the Fly, *Calliphora erythrocephala*, Information Processing in the Visual System of Arthropods, ed. R. Wehner, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1972.
- Langer, H., Patat, U.: Über die Bedeutung einer neuen Augenfärbmutante von *Calliphora erythrocephala* Meig. für die Untersuchung der Funktion des Facettenauges, Verh. Dtsch. Zool. Ges. Saarbrücken 1961, Zool. Anz., Suppl. 25, 174-180.
- Langer, H., Thorell, B.: Microspectrophotometry of single rhabdomeres in the insect eye, Exp. Cell. Res. 41, 1966, 673-677.
- Loewenstein, E.V.: Fourier Spectroscopy: An Introduction, Aspen Int. Conf. on Fourier Spectroscopy 1970, 3-17, AFCRL-71-0019.
- Lubbock, J.: Ameisen, Bienen und Wespen, Beobachtungen über die Lebensweise der geselligen Hymenopteren, Brockhaus, Leipzig 1883.
- Marmarelis, P.Z., Marmarelis, V.Z.: Analysis of Physiologi-

- cal Systems, The White-Noise Approach, Plenum Press, New York-London 1978.
- Neffert, P.: Lokalisierte intrazelluläre Messungen zur Spektral- und Polarisationsempfindlichkeit aus den zentralen Sehzellen der Fliege *Calliphora erythrocephala*, Diss. München 1977
- Minke, B., Kirschfeld, K.: The contribution of a sensitising pigment to the photosensitivity spectra of fly rhodopsin and metarhodopsin, *J. Gen. Physiol.* 73, 1979, 517-540.
- Pak, W.L., Lidington, K.J.: Fast electrical potential from a long-lived long-wavelength photoproduct of fly visual pigment. *J. Gen. Physiol.* 63, 1974, 740-756.
- Parsche, H.: Ein laserkontrolliertes Fourierinterferometer für den sichtbaren Spektralbereich, Diss. München 1973.
- Parsche, H., Luchner, K.: Moderne Methoden der Spektralanalyse, *Physik in unserer Zeit*, 6. Jg., 1975, Nr.5, 151-161.
- Paul, R.: Reizung einzelner Sehzellen der Fliege *Calliphora erythrocephala* mit Licht aus einem Fourierinterferometer für den sichtbaren Spektralbereich, Diplomarbeit an der Universität München, 1977.
- ders.: Experimentalsystem FIS, Ein Programmsystem, unveröff. Manuskript, München 1981.
- Rosner, G.: Adaptation und Photoregeneration im Fliegenauge, *J. Comp. Physiol.* 102, 1975, 269-295.

- Sakai, H.: Consideration of the Signal-to-Noise Ratio in Fourier Spectroscopy, Aspen Int. Conf. on Fourier Spectroscopy 1970, 19-35, AFCRL-71-0019.
- Schreckenbach, Th., Walckhoff, B., Oesterhelt, D.: Studies on the Retinal-Protein Interaction in Bacteriorhodopsin, Eur. J. Biochem. 76, 1977, 499-511.
- dies.: Properties of the Retinal Binding Site in Bacteriorhodopsin: Use of Retinol and Retinyl Moieties as Fluorescent Probes, Photochemistry and Photobiology, Vol. 28, 1978 (a), 205-211.
- dies.: Specificity of the Retinal Binding Site of Bacteriorhodopsin: Chemical and Stereochemical Requirements for the Binding of Retinol and Retinal, Biochemistry 17, 1978 (b), 5353-5359.
- Scott, A.I.: Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products, Pergamon Press 1964.
- Smola, U., Gemperlein, R.: Übertragungseigenschaften der Sehzelle der Schmeißfliege *Calliphora erythrocephala*, 2. Die Abhängigkeit vom Ableitort: Retina - Lamina ganglionaris, J. comp. Physiol. 79, 1972, 363-392.
- dies.: Rezeptorrauschen und Informationskapazität der Sehzellen von *Calliphora erythrocephala* und *Periplaneta americana*, J. comp. Physiol. 87, 1973, 393-404.
- Smola, U. Meffert, P.: The spectral sensitivity of the visual cells R7 und R8 in the eye of the blowfly *Calliphora erythrocephala*, J. comp. Physiol. 133, 1979, 41-52.
- Snyder, A.W., Pask, C.: A Theory for Changes in Spectral Sensitivity Induced by Off Axis Light, J. comp. Physiol. 79, 1972, 423-427.

- Stark, W.S., Ivanyshyn, A.M., Greenberg, R.M.: Sensitivity and photopigments of R1-6, a two-peaked photoreceptor in *Drosophila*, *Calliphora* and *Musca*, J. Comp. Physiol. 121, 1977, 289-305.
- Thomas, J.B.: Einführung in die Photobiologie, (Thieme) Stuttgart 1968.
- Tsukahara, Y., Horridge, G.A.: Visual pigment spectra from sensitivity measurements after chromatic adaptation of single dronefly retinula cells. J. Comp. Physiol. 114 (1977)
- Walther, J., Dodt, E.: Die Spektralsensitivität von Insekten-Komplexaugen im Ultraviolett bis 290 m μ , Z. Naturforschung 14 b, 273-278, 1959.
- Williams, D.H., Fleming, I.: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 2. erw. dt. Aufl. Stuttgart (Thieme) 1971.
- Zettler, F.: Die Abhängigkeit des Übertragungsverhaltens von Frequenz und Adaptationszustand, gemessen am einzelnen Lichtrezeptor von *Calliphora erythrocephala*, Z. vergl. Physiol. 64, 1969, 432-449.
- Zettler, F., Järvillehto, M.: Active and Passive Axonal Propagation of Non-Spike Signals in the Retina of *Calliphora*, J. comp. Physiol. 85, 1973, 89-104.

Lebenslauf

von Rüdiger Paul

25. Mai 1952	Geburt in Neuburg an der Donau
September 1958	Einschulung in die Grundschule in Neuburg
September 1962	Übertritt in das Descartes-Gymnasium in Neuburg
Juni 1971	Reifeprüfung
November 1971	Beginn des Studiums der Biologie an der Universität München
Januar 1977	Abschluß des Studiums mit der Diplom- Prüfung in Biologie an der Universi- tät München
	Seit Juni 1977 wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Dr. R. Gemperlein am Zoologischen Institut der Univer- sität München

